

ANNALES  
DE  
**L'INSTITUT PASTEUR**

**RECHERCHES DE CHIMIOTHÉRAPIE  
DANS LA SÉRIE DU 205 BAYER**

**URÉES DES ACIDES AMINOBENZOYLAMINONAPHTALÉNIQUES**

par ERNEST FOURNEAU, M. et Mme JACQUES TRÉFOUEL  
et JEAN VALLÉE.

**INTRODUCTION**

Vers la fin de l'année 1920 on entendit parler, pour la première fois, sous le nom de « 205 Bayer », d'un nouveau médicament trypanocide. La composition de cette substance est restée jusqu'ici ignorée, les fabricants s'étant refusés à la divulguer en raison, disent-ils, de la difficulté considérable qu'ils éprouvent à se garantir contre la concurrence étrangère. Toutefois, on sait que ce produit ne contient ni arsenic, ni antimoine.

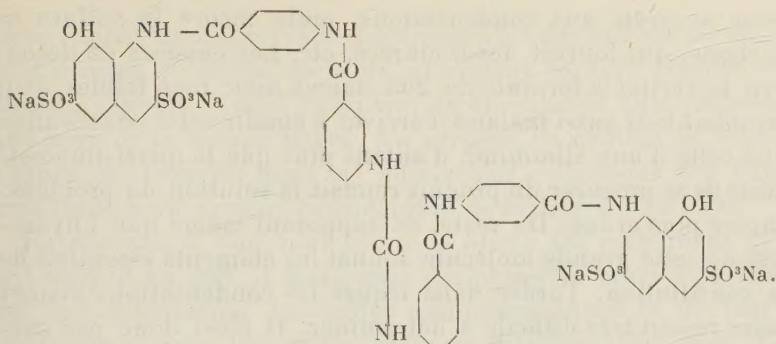
Le 205 fut distribué d'abord à des biologistes allemands, puis à quelques médecins étrangers qui devaient prendre l'engagement d'honneur de n'en point céder à des personnes susceptibles de déterminer sa constitution par la voie chimique (1).

(1) Jusqu'ici, ces engagements ont été scrupuleusement tenus par nos camarades français, et c'est par une voie très détournée que nous avons pu nous en procurer quelques décigrammes.

Les premières publications montrèrent qu'il s'agissait d'une substance douée d'un pouvoir trypanocide exceptionnel : alors que dans la série de l'arsenic on arrivait péniblement à atteindre des rapports chimiothérapeutiques C/T = 1/10 (C = dose curative ; T = dose tolérée), on parlait, dans le cas de 205, de rapports tout à fait invraisemblables de 1/150 à 1/200. Sur des souris on observait quelquefois des guérisons avec des doses de 1/32<sup>e</sup> de milligramme. Malgré le mystère qui entourait le 205, peut-être même à cause de ce mystère, il attira rapidement l'attention de tous les spécialistes des maladies tropicales et, autour de lui, se développa bientôt une atmosphère d'intense curiosité (1).

Que peut-on savoir de la nature chimique de cette mystérieuse substance ? En parcourant la liste des brevets depuis l'année 1912, l'attention est attirée sur toute une série de corps découverts dans les laboratoires des Farbenfabriken Bayer. Ce sont des urées complexes, provenant de certaines amides des principaux acides aminonaphthalène sulfoniques. Or, dans le premier de ces brevets, il est dit que les substances décrites agissent sur les trypanosomes. Les propriétés physiques et chimiques du 205, son origine même, le fait qu'il ne contenait aucun des corps connus jusqu'ici comme formant la base des médicaments trypanocides, conduisaient tout naturellement à soupçonner sa parenté avec les urées décrites dans les brevets. Des formules ont été publiées, en particulier par Karrer, mais elles ne pouvaient avoir d'autre intérêt que de donner une image plus ou moins précise de la constitution du 205 ; dans tous les cas elles faisaient apparaître, même aux yeux des personnes peu familiarisées avec la chimie, la grande complexité de la molécule et le nombre pour ainsi dire infini de substances qui pouvaient en dériver par les transformations même les plus simples. Voici, par exemple, une des formules possibles :

(1) « La découverte du 205 », dit le *British medical Journal* (septembre 1922, p. 569), semble marquer une grande avance dans la médecine tropicale ; seulement c'est un fait remarquable que l'Angleterre dépende ainsi de l'Allemagne pour cette avance, car, jusqu'à présent, l'Allemagne n'a pas de colonies, tandis que l'Angleterre possède le plus grand empire tropical du monde. Nous n'avons aucune raison pour être fiers de cette position, mais sa cause en est bien simple : c'est que l'Allemagne apprécie la valeur des recherches scientifiques pharmacologiques, et pas nous. »



On voit qu'elle est constituée de la manière suivante : l'aminonaphtholdisulfonate de sodium est lié par sa fonction aminée à un reste d'acide aminobenzoïque (1) ; au complexe ainsi formé est combiné un autre radical aminobenzoïque, puis, sur le tout, on fait agir le phosgène qui crée une fonction urée. On peut faire varier la nature de l'acide naphtalène sulfonique, s'adresser par exemple à des acides aminonaphthalène-di-, tri- et même tétra-sulfoniques, à des acides diamino- et amino-naphtolsulfoniques, etc... Naturellement les positions respectives de toutes les fonctions sont susceptibles d'être modifiées. Rien que pour cette première partie de la molécule il existe plus d'une centaine de dérivés simples. Les acides naphtylamino-sulfoniques s'unissent facilement aux chlorures d'acides nitrés les plus divers : nitrobenzoïques (ortho, para, meta), nitrotoluïques, nitrobenzènesulfoniques, nitrosalicyliques, etc. ; ici aussi les positions respectives des fonctions sont interchangeables ; le nombre des chlorures d'acides nitrés possibles est infini. Après la réduction de la fonction nitrée, rien n'est plus simple que de faire agir sur les complexes amino-arylaminonaphthalènesulfoniques obtenus d'autres chlorures nitrés identiques ou différents du premier ; si ces chlorures sont différents, il est possible d'inverser l'ordre de leur action : faire agir d'abord le second, puis le premier, etc... Enfin, on peut réunir par le phosgène deux groupements identiques ou différents.

On voit que le nombre de substances de cette famille est immense et il est accru par le fait que non seulement le phos-

(1) On fait agir en réalité un chlorure d'acide nitré et on réduit ensuite la fonction nitrée.

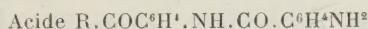
gène se prête aux condensations, mais encore le sulfure de carbone, qui fournit des thiourées, etc. Les chances de découvrir la véritable formule du 205 étaient donc bien faibles, et il semblait tout aussi malaisé d'arriver à établir cette constitution que celle d'une albumine, d'autant plus que la quasi-impossibilité de se procurer du produit rendait la solution du problème encore plus ardue. Du reste, en supposant même que l'hydrolyse de cette grande molécule donnât les éléments essentiels de sa constitution, l'ordre dans lequel les condensations étaient faites restait très difficile à déterminer. Il n'est donc pas surprenant que, jusqu'ici, la formule du 205 soit restée secrète.

La genèse d'une découverte étant toujours instructive, on doit maintenant se demander comment les chimistes de la Maison Bayer sont arrivés à entreprendre des recherches dans une voie en apparence si différente de celles qui étaient parcourues jusqu'ici. Si la formule générale de constitution est bien celle que nous avons donnée, il est cependant aisé de comprendre par quelles étapes les recherches ont passé. En 1904, Ehrlich et Shiga montrent que certaines matières colorantes, en particulier le rouge de trypan ou trypanroth, ont une influence favorable sur les affections à trypanosomes. [Le trypanroth est un produit de copulation de la benzidine sulfonée avec l'acide R ( $\beta$  naphtylaminodisulfo 3, 6)]. Plus tard, Nicolle et Mesnil font paraître un remarquable travail sur le traitement des trypanosomiases par les couleurs de benzidine. Ils mettent en évidence l'influence de certaines fonctions et celle de leur position dans la molécule, et (c'est ce qu'il y a de fort intéressant dans leurs recherches) ils essaient des substances dans lesquelles deux molécules de phénylénediamine sont réunies par un reste oxycarboné CO. L'une d'elles est un produit de condensation de la p-diaminodiphénylurée avec l'acide H; incapable de guérir les souris dès la première injection, elle a raison des rechutes beaucoup plus facilement que certains composés : ceux par exemple qu'on obtient par la copulation de la dichlorobenzidine, de la toluidine-ortho, avec l'acide H. Comme, d'autre part, on connaissait depuis longtemps, dans l'industrie des matières colorantes, les produits de condensation des acides aminobenzoïques avec les acides aminonaphthalènesulfoniques, que même certaines urées de cette

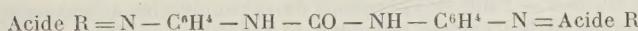
série étaient connues, l'idée d'entreprendre des recherches dans ce domaine, si voisin de celui qu'avaient exploré Nicolle et Mesnil, pouvait en effet s'emparer de chercheurs aussi sagaces que ceux de la Maison Bayer. Au surplus, ils avaient la bonne chance de trouver dans les admirables collections des Farbenfabriken un nombre considérable de matières premières.

En résumé, si l'on veut suivre la filière des recherches qui ont conduit au 205, il faut partir des premiers brevets portant sur la condensation des acides aminobenzoïques et de leurs homologues avec les acides aminonaphthalènesulfoniques. Ce sont là des brevets déjà très anciens concernant des matières premières pour la préparation de matières colorantes. Plus tard, afin de tourner ces brevets qui appartenaient à la Chem. Ind. à Bâle, les chimistes de la Maison Bayer eurent l'idée de fixer, sur les dérivés aminobenzoylés des acides aminonaphthalène sulfoniques, un autre reste aminobenzoylé. Puis sont venues les recherches de Nicolle et Mesnil qui montrent l'importance de la fonction urée : il suffisait de réunir, à l'aide du phosgène, les produits de condensation Bayer, et l'on obtenait ces urées complexes auxquelles se rattache le 205.

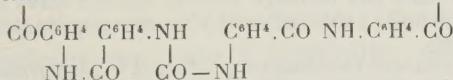
Cet enchaînement de travaux peut être représenté par les formules suivantes qui montrent immédiatement les liens qui les rattachent les uns aux autres.



Substance connue depuis longtemps  
dans l'industrie des matières colorantes.



Couleur Nicolle et Mesnil.



*Après de longs tâtonnements, nous avons réussi à obtenir une substance que nous croyons, sinon identique au 205 Bayer, du moins très voisine. Malheureusement, la quantité de ce dernier médicament que, par une voie très détournée, nous avons pu nous procurer, était très petite, et nous avons dû nous borner à*

des essais comparatifs portant sur des centigrammes de substance, et à l'étude comparative des propriétés trypanocides et physiologiques (1).

### État actuel de la question. — Recherches de laboratoire.

Avant de parler de nos propres recherches, il nous semble utile de donner un aperçu de ce qui a été fait jusqu'ici de plus essentiel sur le 205 Bayer, car nous sommes persuadés qu'il s'agit d'une découverte très importante qui ouvre des horizons nouveaux et même insoupçonnés (2).

Le 205 Bayer a été trouvé grâce à un travail systématique dû à la collaboration de plusieurs chimistes : les Dr<sup>s</sup> Kothe, Dressel et Ossenbeck, sous la direction de Heymann, assisté de Röhl.

C'est une poudre légère, impalpable, faiblement teintée en rose chair, très facilement soluble dans l'eau. La solution peut être stérilisée. Son goût est légèrement astringent. On peut l'injecter sous la peau sans déterminer d'accident local.

Händel et Joetten ont été les premiers expérimentateurs du 205 (août 1920) (3). Ils concluent de leurs recherches que le médicament a une action très marquée sur les trypanosomiases de laboratoire ; il les guérit rapidement quand l'infection est due aux *T. brucei*, *equiperdum*, *equinum*, *congolense*, *rhode-*

(1) Cependant, après hydrolyse du 205 Bayér par l'acide sulfurique, nous pouvons affirmer, à l'aide des réactions de diazo, que les acides naphtolaminosulfoniques et K n'entrent pas dans sa constitution. Nous pouvons dire aussi que ce n'est pas une thiourée. Enfin, nous avons isolé une minime quantité d'un acide aminé d'une saveur très sucrée (caractéristique de certains aminobenzoylés). Cet acide fond un peu au-dessous de l'acide métaminobenzoïque, mais son mélange avec ce dernier acide possède un point de fusion intermédiaire ; s'il s'agissait d'un autre acide, le point de fusion serait très abaissé.

(2) On doit loyalement reconnaître qu'elle fait le plus grand honneur à ceux qui l'ont réalisée, car ils ont poursuivi leurs travaux dans des conditions très difficiles. On ne peut que regretter davantage qu'une collaboration loyale ne puisse s'établir entre chercheurs de tous pays.

(3) C'est dans leur travail que se trouve cette note si typique de la rédaction du journal *Berliner klin. Woch* : « Contrairement à nos principes de ne mettre en publication que des substances dont nous connaissons la composition, nous obéissons cette fois au désir des fabricants à cause de la situation incertaine et sans protection où se trouve l'industrie allemande vis-à-vis des nations étrangères, nos anciens ennemis. »

siense. Une souris de 20 grammes supporte facilement 0 gr. 01 et tolère parfois jusqu'à 0 gr. 018. Chez le rat, la dose toxique est de 0 gr. 08 à 0 gr. 10; chez le cobaye, de 0 gr. 40 par kilogramme; chez le lapin, de 0 gr. 50 par kilogramme dans les veines. La dose curative, pour le cobaye, est de 0 gr. 02, et de 0 gr. 025 chez le lapin. Ils donnent comme coefficient chimio-thérapeutique le rapport 1/60.

En septembre 1920, Mayer essaya ce produit sur une chèvre par la voie stomachale. Il administra à cet animal une dose de 50 grammes dans une période d'environ onze jours : la chèvre fut guérie.

Ses recherches sur les souris montrent que l'on observe des guérisons avec 0 gr. 00006, la dose toxique étant 0 gr. 01.

D'après Brumpt et Lavier, le 205 agit bien dans le cas du *T. venezuelense*, mais pas sur les piroplasmoses ni sur l'anaplasmosis bovine ou le *T. cruzi*.

Händel et Joetten font les mêmes constatations négatives avec le *T. lewisi*, et Mayer et Zeiss avec le *T. cruzi*.

Pröscholdt, Miessner et Schräge n'observent pas non plus la moindre action sur les piroplasmoses.

Dans un cas de kala azar très avancé, le 205 a été essayé par Mollow; mais on ne peut tirer aucune conclusion de cette tentative, car, après l'injection de 0 gr. 25, le malade mourut subitement.

Brumpt et Lavier notent enfin l'action préventive sur les infections à *T.* : une injection de 0 gr. 001 empêche l'infection au troisième jour (*T. brucei*) au dix-huitième jour (*T. venezuelense*), au seizième jour (*T. brucei*).

Tous les essais s'accordent à montrer que le médicament reste longtemps dans l'organisme. Mayer et Zeiss, après avoir traité un lapin par du 205 à la dose de 0 gr. 40 par kilogramme, prirent son sang à intervalles déterminés, et en essayèrent le sérum sur les *T. brucei*, *equinum*, *equiperdum*, etc., etc. Plus la prise de sérum est rapprochée de l'injection, plus grande naturellement est son activité. Il a été possible de guérir des rats atteints de caderas, de dourine, de nagana avec du sérum prélevé cinquante et un jours après l'introduction du médicament.

Plus tard, Mayer et Menk ont décelé des substances trypanocides dans l'urine de personnes ayant pris du 205, cinq jours encore après son administration. Miessner et Berge ont publié cette observation très importante, relatée par Mayer, que des souris guéries ne peuvent pas être réinfectées pendant deux ou trois mois. En outre, Mayer et Zeiss ont vu que le 205 exerce une action prophylactique chez les chèvres et les chiens; chez la chèvre, la substance est surtout excrétée par le lait.

Wenyon, à la suite d'une série d'expériences sur la souris infectée de *T. equiperdum*, montra que le médicament est très spécifique. A la dose de 0 gr. 005 par kilogramme de souris il amène la disparition permanente des trypanosomes. D'autre part, on peut facilement injecter 0 gr. 50 par kilogramme. En général, le rapport C/T = 1/60 à 1/100.

L'action du médicament n'est pas immédiate et les trypanosomes ne disparaissent que dans les quarante-huit heures. On sait que, dans le cas de l'arsenic, et surtout de l'antimoine, la destruction des parasites est très rapide.

Notons encore quelques recherches biochimiques. Steppuhn, Zeiss et Brychonenko ont vu que le 205 rend le sang incoagulable; de très petites doses diminuent la coagulabilité et, avec des doses moyennes (0 gr. 30 par kilogramme dans les veines), l'action dure plusieurs heures; en même temps, la température augmente et dépasse la normale de 3°. On note une forte accumulation du médicament : une deuxième injection d'une dose non encore toxique (0 gr. 60 pour un lapin), deux jours après la première, fait baisser énormément la température (40°8—33°). La somme des deux doses agit bien plus fortement qu'une quantité double injectée en une seule fois.

La stérilisation du 205 ne l'altère pas. La propriété qu'il possède de protéger l'albumine du sang a conduit les auteurs à l'essayer sur les albumines. Ils remarquent que le sérum additionné de ce médicament devient incoagulable par la chaleur; de même, dans le plasma additionné de 205 et chauffé à 53°, il ne se fait pas de fibrinogène. Pour chaque espèce d'albumine, il faut des quantités variables de produit. Enfin, si l'on ajoute du 205 à une solution très étendue de gélatine, une trace d'acide donne un précipité volumineux : la réaction est encore

nette avec 1/50.000<sup>e</sup> de 205. Cette influence sur l'albumine est tellement forte, qu'une solution de serum mélangée avec le Bayer ne précipite plus par le tanin et par le sublimé.

Quelques-unes de ces propriétés permettent de prévoir plusieurs utilisations du 205 : dans la transfusion du sang et en bactériologie (emploi de l'albumine rendue incoagulable).

Shigemoto Sei a fait porter ses essais sur le sang des lapins. Il a noté : une diminution des hématies et de l'hémoglobine qui atteint son maximum après quelques jours, l'apparition de globules rouges nucléés. Il n'a pas observé d'influence sur le nombre des leucocytes, mais les polynucléaires sont fortement touchés.

Ruppert confirme les modifications du quotient chimio-thérapeutique suivant l'espèce animale. Alors qu'il suffit parfois de 1/400<sup>e</sup> de la dose mortelle pour guérir une souris, le rapport n'est plus que de 1/10<sup>e</sup> pour le lapin ; quant au cheval, la dose toxique est 25 fois plus grande que pour le lapin (par kilogramme d'animal). *A priori*, par conséquent, le C/T pour le cheval doit être bien inférieur à ce qu'il est pour le lapin.

A la suite de ces essais, Ruppert a institué des expériences sur le cheval infecté de caderas. Sur les grands animaux la difficulté de traitement vient de ce que des doses insuffisantes peuvent provoquer un état d'immunité instable : l'animal paraît guéri, on ne trouve plus de T. dans son sang, cependant un travail prolongé fait apparaître les parasites. Les essais sur le cheval ont été faits par Ruppert dans 2 directions : 1<sup>o</sup> Il a voulu préciser la durée de l'action du 205 sur un animal infecté plus ou moins longtemps après l'injection : c'est ainsi qu'avec des doses de 0 gr. 75 par 50 kilogrammes, le cheval a été protégé pendant respectivement quinze, cinquante, trente-quatre jours ; 2<sup>o</sup> Il a ensuite déterminé la dose curative chez le cheval infecté et il a vu qu'il suffisait de 0 gr. 50 par 50 kilogrammes, pour obtenir la guérison définitive (la dose toxique étant de 1 gramme par 50 kilogrammes).!

A la suite de Mayer et Halberkahn, Shigemoto Sei a recherché le 205 dans les organes. Un cobaye reçoit 0 gr. 10 du médicament le 30 novembre, puis encore 0 gr. 10 le 4 décembre ; il est sacrifié le 5 décembre par égorgement et on met le sang à part.

Les extraits d'organe sont presque tous actifs; ceux du rein font disparaître complètement les *T.*, parfois définitivement; avec les capsules surrénales, disparition temporaire ainsi qu'avec le foie; la rate et le cerveau sont inactifs. Longtemps après le traitement par le 205, l'action des extraits est encore manifeste.

La nocivité du 205 *in vitro* pour les *T.*, étudiée par Schuckmann, n'est pas très forte. Hesselbach fait la même observation sur le *T. equiperdum*; il a examiné en outre le sang de cobayes traités par 0 gr. 02 dans le péritoine; après une demi-heure les parasites sont encore mobiles; ils semblent plus gros que les parasites normaux, le noyau est moins coloré, les contours sont moins nets, le blépharoblaste est souvent en voie de diffusion et sa vacuole est très volumineuse. Après cinq heures le nombre de parasites commence à diminuer.

#### Essais sur l'homme. Traitement de la maladie du sommeil.

Tous ces résultats de laboratoire ayant été des plus satisfaisants, le 205 fut essayé dans le traitement de la maladie du sommeil.

Le premier cas, bien souvent relaté, est celui d'un malade traité par le professeur W. Yorke de Liverpool, et infecté de *T. rhodesiense*. Après avoir été soumis en vain à un traitement énergique par l'émétique, il fut envoyé à Hambourg et soigné par Mühlens et Menk. On fit d'abord à ce malade une injection de 0 gr. 50 de 205 dans 10 cent. cubes de sérum physiologique sans observer aucune réaction; deux jours plus tard on injecta 1 gramme, puis encore 1 gramme après un intervalle d'une semaine. Cette injection fut suivie d'albuminurie et dans les urines on trouva des globules rouges et des cylindres. Le traitement fut interrompu. Les *T.* avaient disparu du sang déjà seize heures après la première injection et, depuis, ils ne reparurent plus. Le malade, qui était arrivé le 3 juillet 1921 à Hambourg, retourna à Liverpool le 13 septembre ayant gagné 7 kilogrammes et se considérant comme tout à fait guéri. Il put repartir pour l'Afrique et, depuis, il n'a plus eu de rechute.

Mayer et Menk relatent encore le cas d'un Belge ayant

contracté au Congo une infection résistant à l'atoxyl et au salvarsan et dont le sang, deux ans après l'infection, contenait encore beaucoup de trypanosomes. Il fut alors traité par le 205 et reçut 4 injections de 1 gramme dans les veines entre le 30 mars et le 8 avril 1922 : les *T.* disparurent douze heures après la première injection. A la suite de la médication on observa une irritation cutanée qui, par places, devint purulente ; en même temps on trouva de l'albumine dans les urines ainsi que des cylindres et des cellules épithéliales, mais l'albumine finit par disparaître.

Nous arrivons aux observations de Low et Manson-Bahr qui sont relatées avec beaucoup de précision. Ils débutèrent par une injection de 1 gramme et, comme ils espéraient guérir le malade avec une seule dose (les résultats sur l'animal permettant en effet tout espoir), ils attendirent pour pratiquer la deuxième injection ; mais, quatorze jours après la première les trypanosomes reparurent dans le sang. La deuxième injection fut alors faite, puis une autre : en tout 5 grammes. Quinze jours après la dernière piqûre, les trypanosomes reparurent et comme, entre temps, l'urine contenait de l'albumine, l'emploi du 205 fut cessé et on traita le malade par l'atoxyl et l'émétique. L'albumine disparut peu à peu. On reprit le traitement au 205, environ six mois après, et on injecta jusqu'à 10 grammes de ce produit : l'état du malade s'améliora complètement, mais il conserva un peu d'albuminurie.

En décembre 1921, deuxième cas très grave ayant résisté à toutes les formes de médication et même au sérum salvarsané de Marshall. Au moment de l'injection du 205 le sang contenait beaucoup de trypanosomes. Presque tout de suite l'amélioration se manifesta ; les parasites disparurent et on put considérer la guérison comme acquise. Néanmoins on injecta de temps en temps des doses de 1 gramme qui furent supportées sans albumine. La quantité totale fut de 10 grammes.

Ce cas étant très favorable, on résolut de donner désormais 10 grammes à chaque malade à raison de 1 gramme par semaine. Plusieurs fois cependant on fut obligé d'augmenter les doses.

A la fin de leur mémoire, Low et Manson-Bahr rassemblent quelques observations sur les phénomènes cliniques consécutifs à l'emploi du 205.

Chez un malade, le dernier, apparut après la deuxième injection un érythème qui commença par les avant-bras et s'étendit progressivement à tout le corps. On observa le même phénomène chez deux autres trypanosomés.

Comme nous l'avons dit, l'albuminurie est le phénomène accessoire le plus constant, L. et M.-B. y insistent tout particulièrement et nous croyons devoir relater succinctement, à la suite les unes des autres, quelques-unes de leurs observations :

Albumine après 2 grammes de 205 (pas de cylindres) ; elle disparut peu à peu et ne reparut pas, même après une nouvelle série d'injections (8 grammes en tout). — Le malade avait de l'albumine et des cylindres avant le 205 et il ne semble pas que l'emploi de cette drogue ait produit une aggravation. — Trace d'albumine avant le 205. Pas d'augmentation. — Après 10 grammes de 205, albumine et cylindres qui persistent pendant cinq mois. Albumine et cylindres après la troisième injection. Les cylindres disparaissent, mais une trace d'albumine persiste. — Albumine et cylindre après la cinquième injection. Albumine persiste. — Trace d'albumine avant le traitement, n'augmentant pas après le traitement. L'urine devient normale à la fin de la cure. — Albumine et cylindres épithéliaux apparaissent dans l'urine après 4 grammes de 205. Par contre, après que 14 grammes eurent été injectés, on ne trouve plus rien dans l'urine.

La deuxième série d'injections différa notablement de la première, car de plus grandes quantités furent données et les injections furent plus rapprochées. Malgré cela, les urines restèrent normales pendant la cure (alors que 15 grammes de 205 avaient été injectés en l'espace de quatorze jours). Par contre, longtemps après le traitement, l'albumine et les cylindres firent leur apparition.

*Doses tolérées chez l'homme.* — L'homme paraît supporter de très grandes quantités de 205. Dans un cas, tout au moins, 2 grammes en une seule fois furent bien tolérés et ne donnèrent même pas d'albuminurie. On peut introduire 6 grammes par semaine dans les veines avec une certaine sécurité. (Mayer et Zeiss ont pu monter jusqu'à 22 grammes en dix-sept jours.)

Low et Manson-Bahr ont à signaler deux cas de mort : un malade chez lequel un traitement de 18 grammes fut suivi

d'une amélioration temporaire mais ne suffit pas à le sauver, et un autre qui eut une rechute suivie de mort après 29 grammes.

En résumé, neuf malades ont été traités (infections à *T. gambiense* et à *T. rhodesiense*); sept semblent avoir été favorablement influencés, deux ont succombé par suite de l'envahissement du système cérébro-spinal, et cela malgré de très fortes doses de 205.

On peut injecter, à intervalles réguliers, 1 à 2 grammes dans les veines, en solution à 10 ou 20 p. 100. Dans la plupart des cas une dose totale de 10 grammes paraît suffisante; parfois cependant les *T.* reviennent dans la circulation après 5 injections; dans ces cas seulement il faut forcer la dose jusqu'à 20 grammes.

L'effet sur l'épithélium rénal est à surveiller avec soin, car il est susceptible de donner des soucis. Toutefois ni l'albumine, ni les cylindres ne constituent un obstacle à l'emploi du 205.

Ces observations sont suivies de l'examen des cerveaux de deux malades qui ont succombé. (Stevenson.)

Un autre travail a trait à l'action trypanocide du sérum et du liquide céphalo-rachidien des malades traités par le 205 sur une race de *T. rhodesiense* (Wenyon). Ces liquides agissent temporairement sur les infections des souris, c'est-à-dire qu'ils font disparaître les trypanosomes, mais ceux-ci reparaissent. On ne peut donc guérir définitivement la souris.

Enfin, un mémoire contient des observations relatives à l'action de l'urine des malades traités par le 205 sur l'infection expérimentale due au *T. rhodesiense* (Thomson et Robertson, p. 391). Une seule injection chez le rat infecté par ce parasite fut suivie d'une disparition momentanée des trypanosomes.



Entre temps la Maison Bayer avait envoyé en Afrique une mission spéciale sous la direction de Kleine et Fischer. Les résultats de cette mission ont été consignés dans deux rapports dont nous allons donner un résumé. Voyons en premier lieu ce qui fut tenté sur la maladie du sommeil.

Il faut distinguer entre l'infection due au *T. rhodesiense* (Rhodesia) de celle du Congo (*gambiense*). Les premières expé-

riences furent faites près des lacs Tanganika et Victoria. Par la bouche, l'action est très faible et ne peut être utilisée que comme médication adjutante. Si l'on injecte le 205 sous la peau, on note, au point où l'aiguille pénètre, un léger œdème qui disparaît au bout de très peu de jours; pas d'abcès et peu de fièvre, mais souvent de l'albumine. Le traitement comporte des injections de quantités assez fortes (1 gr. à 1 gr. 50 chaque fois.)

Voici un type d'expériences :

Européen de quarante-huit ans, malade depuis le 10 décembre 1921. Fièvre irrégulière; perte de poids, 15 kilogrammes. On note un léger œdème au pied. Il est transporté au camp le 14 janvier. Son sang contient beaucoup de trypanosomes, mais les glandes ne sont pas encore gonflées. On lui fait absorber 1 gramme de 205 par la bouche, puis le 15 et le 16 janvier, encore 1 gramme. Enfin on injecte 1 gr. 2 dans les veines. L'albumine apparaît alors; nonobstant, une deuxième injection de 1 gramme est pratiquée. Les forces reviennent, la température est normale, l'albumine disparaît et le malade quitte le camp vingt-sept jours après son entrée. Après son départ il reçoit encore 2 grammes de 205 tous les quinze jours.

Six autres malades furent soumis au même traitement, mais l'un d'eux mourut de récidive à Londres (il n'avait reçu que 2 injections). Vers le milieu de juin 1922, trente malades furent traités, seize étaient déjà assez avancés et dormaient presque continuellement. On leur fait une première injection de 1 gramme sous la peau, dans le village même où ils se trouvent, puis ils sont transportés au camp après une dizaine de jours; le dixième jour on renouvelle l'injection, puis encore le vingt-huitième jour. Chaque fois qu'un examen du liquide céphalo-rachidien décèle la présence de parasites, on fait une troisième piqûre, et même, dans les cas de récidive, une quatrième et une cinquième. Chez tous les malades les trypanosomes disparurent du sang; par contre, chez vingt et un d'entre eux on en rencontra dans le liquide céphalo-rachidien; cependant sept des sujets traités paraissaient bien portants et pouvaient se livrer aux travaux les plus pénibles. *Cela permet de penser que si le 205 ne tue pas les parasites dans le canal rachidien, il les affaiblit.* Sur trente-sept malades, trois sont

morts (deux avaient été notés comme très atteints avant le traitement).

Au Congo, 91 malades furent traités, la plupart à la deuxième période (gonflement des glandes). Le sang fut examiné tous les huit jours. Chez tous les malades, les glandes disparurent très rapidement. Presque tous déclarèrent que leurs forces étaient revenues et qu'ils se sentaient parfaitement bien. Le 9 mai 1923 (début du traitement fin décembre 1922), on ne trouva des trypanosomes que chez 22 sujets. Il ne semble pas que les malades à la troisième période (phénomènes nerveux) aient été très améliorés : il s'agissait probablement de lésions permanentes. En définitive, ces résultats ne sont pas particulièrement brillants, on en a d'aussi bons avec l'atoxyl ; du moins faut-il attendre avant de se prononcer.

Le 205 a été encore essayé sans succès dans la malaria et sur la fièvre récurrente, par Weichbrodt; sur la leishmaniose brésilienne, par Lindenberg ; sur cette infection, le 205 possède une certaine action spécifique, mais pratiquement, on ne peut l'utiliser, car, d'une part, la maladie qui a un caractère chronique accentué nécessite des soins prolongés et, d'autre part, l'albumine, qui apparaît à un moment donné du traitement, oblige à l'interrompre.

#### Essais sur les trypanosomiases animales naturelles.

On sait que les résultats fournis par les essais de laboratoire ne correspondent pas à ceux qu'on observe dans les infections naturelles; cela tient vraisemblablement à ce que, plus on avance dans l'échelle animale, plus la sensibilité de l'organisme est grande vis-à-vis des médicaments; le rapport chimiothérapeutique tend alors vers l'unité à cause de l'augmentation du dénominateur de la fraction C/T. L'activité du 205 dépassant cependant tout ce qu'on a observé jusqu'ici, il n'est pas surprenant que la Maison Bayer ait couru les risques d'une expérimentation dont le prix a été certainement très élevé.

Fort heureusement, une occasion se présenta qui permit de faire des essais, en Allemagne même, sur une épidémie qui a toujours été plus ou moins à l'état endémique dans certaines

régions de l'Europe et qui est connue sous le nom de maladie du coït ou dourine. C'est la seule maladie à trypanosomes que l'on ait signalée dans nos pays. L'épidémie se développa surtout en Thuringe par suite de la mobilisation et prit tout de suite une assez grande extension. Les essais purent être faits sur 116 chevaux par le professeur Pfeiler, de l'Université d'Iéna. La plupart des chevaux traités ont été guéris; sur quelques-uns, le médicament resta sans action; chez d'autres, il fut insuffisant; certains, apparemment guéris, eurent des rechutes. Enfin, une jument réfractaire à tout traitement par le 205 fut, au contraire, guérie par l'atoxyl.

Ellinger note encore que chez beaucoup de chevaux la maladie est latente; pour la manifester, on injecte une solution d'adrénaline à 1/10.000 (10 à 30 cent. cubes, 3 fois en suivant), ce qui a pour effet de mobiliser les *T*. Il combine le traitement par le 205 à l'emploi de l'émiétique et de l'atoxyl. Lichtenheld et Walther traitent les chevaux par l'atoxyl et l'émiétique. Ils ont essayé le 205 avec succès dans 6 cas.

Le pouvoir curatif et préventif du 205 put être ainsi établi sur les grands animaux et c'est à la suite de ces expériences que le professeur Klein et le Dr Fischer entreprirent leur mission. Les essais sur les animaux ont porté d'abord sur la tsé-tsé des bovidés (action curative et préventive), puis ils prirent la direction suivante vraiment intéressante : il s'agissait de savoir si des mouches infectées seraient débarrassées de parasites après avoir piqué et sucé le sang des animaux traités par le 205. Comme nous l'avons dit, les essais devaient être préventifs et curatifs.

On peut dire que la prophylaxie du nagana est d'une très grande importance. Il existe en Afrique de nombreux pays où l'agriculture est impossible parce qu'ils sont entourés comme d'une espèce de ceinture de mouches. Le bétail indigène peut être sain, mais presque tous les animaux qu'on envoie pour améliorer la race ou tous ceux qu'on exporte, deviennent malades après avoir traversé la zone infestée. On comprend tout l'intérêt qu'il y aurait à garantir les animaux de la maladie pendant un temps même court.

Nous passons rapidement sur tous les essais; ils sont fort ingénieux et ils consistèrent en principe à nourrir des mouches

prisonnières sur des animaux malades, bovidés ou singes. Les expériences sur les singes ne sont pas intéressantes, parce que, d'une part, le singe n'est jamais infecté naturellement, son odeur semblant déplaire fortement aux mouches et que, d'autre part, ils sont très facilement guéris par le médicament. Par contre, sur les bovidés, les résultats ne furent pas brillants : par la voie buccale, même de fortes doses (jusqu'à 20 grammes) n'agirent pas et on fut obligé d'injecter des quantités élevées (jusqu'à 10 grammes); dans ces conditions, des animaux ayant été soumis, après le traitement, à la piqûre de 750 mouches, ne furent pas infectés.

Ce qui gêne beaucoup les expériences, c'est que la plupart des animaux sont porteurs de trypanosomes variés, en particulier de *T. bovis* qui ne réagit pas au Bayer.

Il est à noter que les mouches infectées ne perdent pas leur caractère infectieux après avoir sucé le sang des animaux traités par le 205; on ne peut donc réussir à détruire les parasites dans les glandes salivaires des insectes, pas plus qu'on ne peut influencer les infections quand elles se développent dans l'intestin.

Cependant, les résultats ne sont pas si défavorables qu'ils peuvent paraître à première vue. Tandis, en effet, que les animaux non traités devenaient presque immédiatement malades en traversant les districts où sévissait la mouche tsé-tsé, prenaient un aspect squelettique et mouraient parfois avant d'arriver aux centres d'abats, les animaux traités se sont maintenus dans une forme satisfaisante pendant de longs mois, et on put les amener à bon port dans un état utilisable pour la boucherie.

*Si on arrive à fabriquer le 205 à un prix abordable, il semble possible de ravitailler les centres côtiers à travers les districts où règne la maladie.*

Des essais très sérieux ont été faits également dans le traitement du surra, en particulier par Rodenwaldt et Douwes, ainsi que par Baermann. Les résultats observés par les premiers ne sont pas très favorables : l'action trypanocide du 205 est nette, les *T.* disparaissent du sang rapidement, mais à la condition d'injecter des doses très élevées. En un mot, aux doses à partir desquelles ils obtiennent des effets curatifs cer-

tains, on a des effets toxiques dans 50 p. 100 des cas. Voici les conclusions des auteurs :

1<sup>o</sup> Chez le cheval, l'organotropie et la parasitotropie sont très voisines, le rapport C/T est, par conséquent, très faible;

2<sup>o</sup> L'emploi des hautes doses sûrement curatives est impossible;

3<sup>o</sup> L'emploi des petites doses souvent répétées n'empêche pas les récidives; d'autre part, il y a un effet cumulatif qui amène des intoxications.

Et voici les mesures radicales que R. et D. préconisent : tuer les animaux dans un état avancé de la maladie, car ils ne peuvent être sauvés par le 205; tous les animaux infectés, lorsqu'on peut les traiter dès l'apparition des phénomènes cliniques, peuvent recevoir en tout 10 à 15 grammes de 205 par 200 kilogrammes à la dose de 5 grammes tous les deux jours; tout récidiviste doit être sacrifié; tout animal suspect doit être traité par 1 gramme pour 150 kilogrammes; cette dose doit être répétée après quatre semaines.

Les résultats obtenus par Baermann, qui semblaient d'abord des plus favorables, se sont trouvés moins bons par la suite.

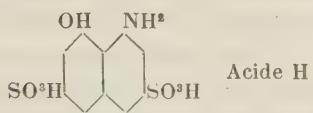
Nous n'avons donné ici que les extraits des travaux les plus caractéristiques, mais ils suffisent largement pour se faire une opinion sur l'état actuel de la question du 205. A la fin de ce travail, nous donnons une bibliographie assez complète.

#### Recherches personnelles.

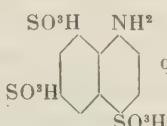
Nos recherches ont été entreprises, il faut l'avouer, sans trop d'espoir. Le hasard nous a évidemment servis, car nous aurions pu travailler pendant des années encore sans arriver à aucun résultat. Bien des fois même, découragés, nous avons eu le désir d'interrompre la poursuite d'un but qui semblait fuir devant nous.

Nous avons pris comme point de départ une des nombreuses substances décrites dans les brevets Bayer, provenant de ce qu'on appelle l'acide H ou acide aminonaphtholdisulfonique I-8-3-6. Puis, nous avons étendu les recherches à d'autres acides naphtylaminosulfoniques. Pour éviter de les reproduire chaque fois, nous donnons ci-dessous les formules

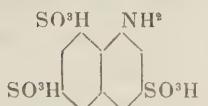
développées des trois principaux acides utilisés par nous :



### Acide H

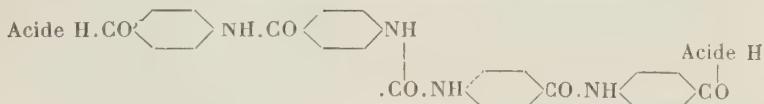


que nous désignerons  
par la lettre B.

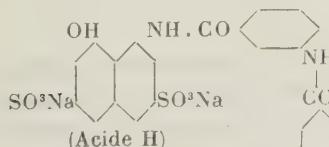


### Acide K (1)

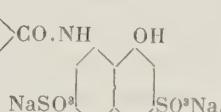
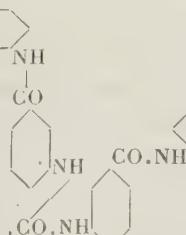
Les recherches sur les dérivés arsenicaux nous ayant montré que les dérivés para-aminobenzoylés de l'atoxyl étaient plus actifs que les dérivés méta-, les premiers essais de condensation ont porté sur l'acide para que nous avons d'abord copulé avec l'acide H ; puis, sur la substance obtenue, nous avons fait agir une nouvelle molécule de l'acide para-aminé. Enfin, tous ces complexes ont été condensés avec le phosgène (2).



Voici le résultat de l'essai sur les souris (tous nos poids sont calculés sur des souris de 20 grammes). Toxicité environ 0 gr. 012. Avec 0 gr. 0025, on n'observe pas d'action curative (nagana); avec 0 gr. 010, c'est-à-dire avec une dose très voisine de celle qui est toxique, on note que les trypanosomes continuent à augmenter le premier jour, puis diminuent et, le quatrième jour, la souris est débarrassée de parasites; le sixième jour, rechute et le neuvième jour, mort. Nous avons alors essayé le dérivé de l'acide m-aminobenzoïque :



(Acide H)



<sup>1)</sup> Pour simplifier, nous désignons par la lettre K l'acide de Koch, le vrai acide K possède une toute autre constitution.

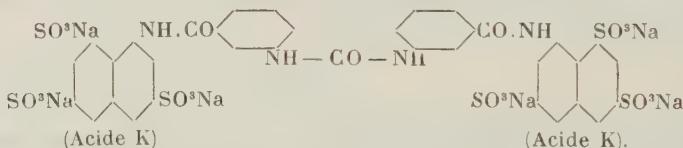
(2) Nous n'avons que peu de renseignements opératoires à fournir, car nous avons suivi au début les conditions de préparation exposées dans les brevets. Les détails de préparations paraîtront d'ailleurs à une autre place.

d. m. t. = 0 gr. 012 environ (la souris est morte après l'injection de 0,015 et est tout à fait normale après 0,010).

Action curative : avec 0,0025, les *T.* continuent à augmenter pendant le premier jour ; le troisième jour, disparition des parasites ; le sixième jour, rechute ; le huitième jour, mort. Avec 0,005, les *T.* augmentent le premier jour ; puis diminuent ; puis disparaissent : la souris est guérie.

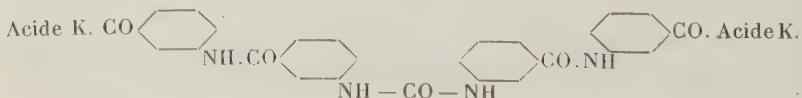
On observe déjà, par conséquent, une différence très nette entre les acides méta- et para-aminobenzoïques ; mais, ces résultats nous ayant paru bien insuffisants, nous nous sommes adressés à l'acide amino-1-naphthalène trisulfonique-3-6-8 que nous désignons par la lettre K.

Pour étudier l'influence d'un seul noyau, nous avons copulé l'acide K avec l'acide m-aminobenzoïque; puis, sur le complexe obtenu, nous avons fait agir le phosgène :



Des doses de 0,0005, 0,004, 0,005, 0,010 n'ont aucune action.

Nous avons alors opéré la condensation avec 2 mol. d'acide m-aminobenzoïque, de façon à obtenir le corps suivant :

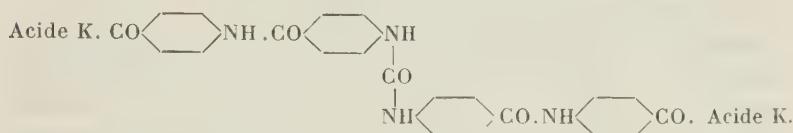


Toxicité : 0,010, donne un peu de diarrhée pendant dix jours; puis l'animal se rétablit, mais il meurt un mois après; 0,012, un peu de diarrhée; puis, l'animal redevient normal; 0,015, on observe également de la diarrhée pendant dix jours; puis l'animal se rétablit et il meurt, comme dans le premier cas, un mois après.

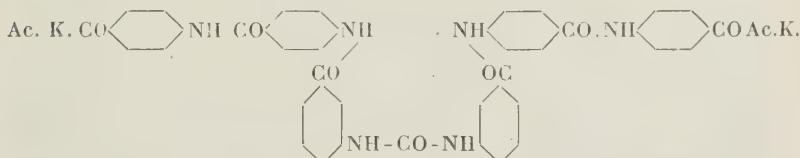
Action curative : 0,0005, nulle. 0,001 débarrasse la souris de ses *T.* le troisième jour; rechute, le sixième; mort, le treizième. Il faut noter ici le grand retard dans l'évolution de la maladie après la rechute. 0,0025 : disparition des *T.*, le

deuxième jour; rechute le sixième; mort le dixième. 0,005 : guérison définitive. Rapport  $\frac{C}{T} = \frac{4}{3}$ .

Par conséquent ici, comme dans le cas de l'acide H, on observe une action très nette quand on met en œuvre l'acide m-aminobenzoïque. Du reste, le cas suivant montre l'influence défavorable du reste p-aminé. En effet, la même condensation que la précédente, mais opérée avec cet acide, a fourni une substance tout à fait inactive, même à la dose de 0,010.



Constatant une augmentation nette de l'activité thérapeutique, quand on passait d'une urée à un seul noyau aminobenzoylé à l'urée à deux noyaux, nous avons étudié l'influence de trois noyaux : les deux premiers en position para et le troisième en position méta :



Ce produit n'agit pas sur le nagana expérimental.

Comme on le verra dans des exemples ultérieurs, l'introduction d'un troisième noyau a toujours une action nettement défavorable. Cette constatation a restreint fort heureusement le champ de nos recherches.

Nous sommes alors revenus à 2 noyaux, le premier étant l'acide amino en para, et le deuxième l'acide amino en méta :

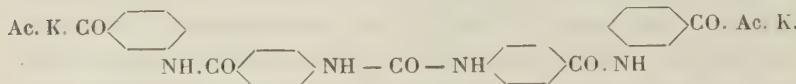


Ce produit n'est pas très toxique : les souris supportent 0,015.

Avec 0,0025 on peut prolonger la vie de la souris pendant trois jours sans que jamais les T. disparaissent. Avec 0,005

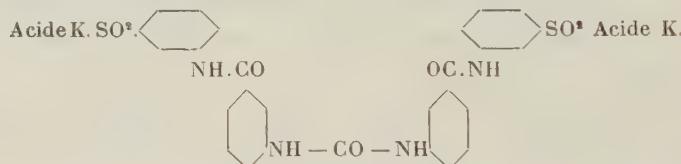
disparition temporaire des parasites, mais l'animal meurt cinq jours après l'injection.

Nous avons essayé ensuite la première condensation avec l'acide m-amino et la deuxième avec l'acide p-amino.



Ici encore, résultat négatif: aucune action à 0,010 alors que la souris ne supporte même pas 0,015.

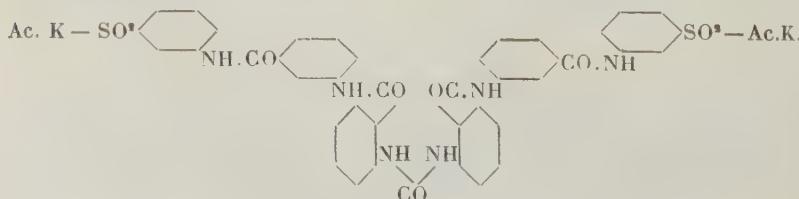
Dans certains brevets Bayer on peut lire la description d'une substance préparée à l'aide d'acide méta-aminobenzènesulfonique. Nous avons alors essayé cet acide et nous l'avons condensé avec l'acide K; sur le produit de copulation obtenu, nous avons fait agir successivement l'acide m-aminobenzoïque, puis le phosgène :



Cette substance est plus toxique que les autres : la souris ne supporte pas 0,010. Avec 0,012, elle meurt en cinq jours. Avec 0,015 elle meurt le lendemain.

Des doses inférieures à 0,005 n'ont pas d'influence notable sur la marche de l'infection. Avec 0,005 on observe une disparition temporaire des parasites, mais le sixième jour il se produit une rechute et l'animal meurt le neuvième. Enfin avec 0,010 les *T.* disparaissent, mais l'animal meurt intoxiqué.

L'adjonction d'une nouvelle molécule d'acide m-aminobenzoïque au corps précédent augmente légèrement son activité thérapeutique.



Ici, par conséquent, et exceptionnellement, trois noyaux agissent mieux que deux, tout simplement parce que le complexe urée m-aminobenzoylmétaaminobenzoïque est un support particulièrement parasitotrope.

Quoi qu'il en soit, cette substance est assez toxique. La souris ne supporte même pas 0,010 ; elle devient malade à partir du quatrième jour et meurt le onzième jour. Avec 0,015 elle meurt le lendemain.

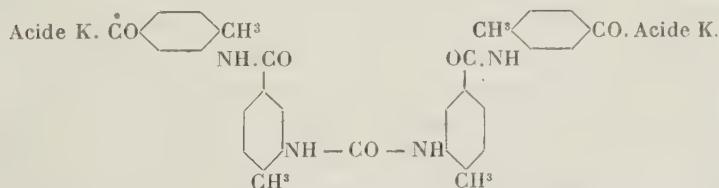
La dose de 0,005 guérit définitivement l'animal, mais il est fort malade du septième au dixième jour.

Nous avons alors remplacé un des acides aminobenzoïques par l'acide méta-aminophénylacétique : l'échec a été complet :



Ce corps n'a aucune action même à la dose presque toxique de 0,010.

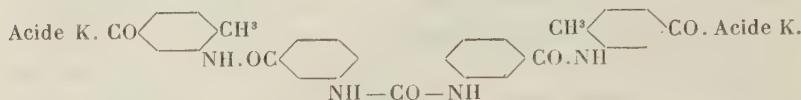
Ayant opéré à peu près toutes les substitutions possibles dans les séries simples, nous avons essayé de mettre en œuvre des acides méthylés dans le noyau, en particulier l'acide p-méthyl-m-aminobenzoïque :



Cette substance est peu toxique et la souris en supporte facilement 0,015, mais elle n'est pas très active : en effet, 0,005 ne peuvent prolonger la souris que pendant trente-six heures environ.

Constatant, d'une part, que malgré la faible action curative de la molécule précédente la toxicité semblait diminuer par l'introduction du groupe méthyl, et ayant à plusieurs reprises, d'autre part, noté comme une sorte de spécificité du complexe urée acide méta-aminé, nous avons d'abord condensé l'acide K

avec l'acide m-aminotoluïque, puis le produit obtenu, avec l'acide m-aminobenzoïque :



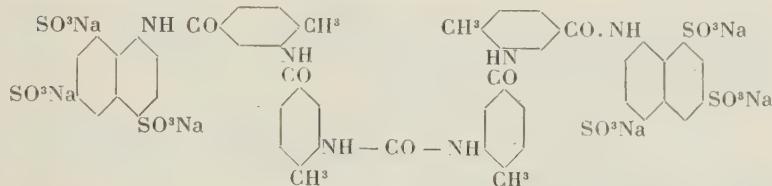
Cette urée est beaucoup plus active que les précédentes. La toxicité varie entre 0,010 et 0,012.

Avec 1/32 de milligramme et 1/16 de milligramme, qui sont des doses déjà très actives quand il s'agit du 205, on n'observe pas d'action, mais avec 1/4 de milligramme la diminution des *T.* est très accentuée le lendemain, et quarante-huit heures après les parasites ont disparu ; la souris reste trois jours à 0, mais elle meurt de rechute. Avec 1/2 milligramme, il y a encore quelques parasites après quarante-huit heures (environ 1 pour 50 champs) et l'animal reste trois jours à 0 ; le cinquième jour on observe une rechute ; le sixième les *T.* ont de nouveau disparu, et enfin le neuvième jour, la souris meurt accidentellement et sans parasites. Chez une deuxième souris l'infection suit une marche à peu près analogue ; après disparition temporaire des *T.*, on observe une rechute le sixième jour, puis de nouveau disparition des *T.*, et le vingtième jour nouvelle rechute suivie de mort huit jours après. Une troisième souris est guérie pendant quatre jours, puis meurt de rechute. Une quatrième souris, après une légère rechute le troisième jour, est guérie pendant quatorze jours puis rechute. Avec 0,001, deux souris traitées voient disparaître leurs *T.* vingt-quatre heures après l'injection et sont guéries définitivement. Enfin une autre souris a rechuté le huitième jour et a mis ensuite dix jours pour mourir avec diminution des parasites vers le quatorzième jour. Rapport  $\frac{C}{T} = \frac{1}{12}$ .

Ces résultats sont déjà fort intéressants, mais ils sont loin de valoir ceux qu'on observe avec le 205. Ne voyant pas beaucoup de possibilité de les améliorer en partant de l'acide K, nous avons fait porter nos investigations sur un autre acide naphtalénique : l'acide 1-amino-4-6-8-naphtalènetrisulfonique, que nous désignerons par la lettre *B* et dont un dérivé est signalé dans l'encyclopédie d'Ullmann comme ayant servi à Bayer pour

ses substances trypanocides (1). L'acide B ne se trouve pas dans le commerce et nous avons dû le préparer, non sans difficultés.

Presque tout de suite nous avons pu nous convaincre que ses dérivés étaient plus actifs que ceux de l'acide K. C'est ainsi que le produit de condensation de deux restes méta-



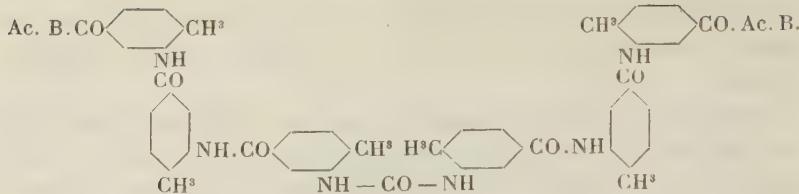
aminotoluiques avec l'acide B, est bien plus actif que le dérivé correspondant de l'acide K. Toutefois c'est une substance assez毒ique, car la souris supporte à peine la dose de 0,01 ; avec 1/16 de milligramme la mort des animaux infectés de nagana est retardée de un jour. Avec 1/8 de milligramme, de deux jours. Avec 1/4 de milligramme de six à huit jours, avec seulement disparition temporaire des *T*. Avec 1/2 milligramme la prolongation est de dix jours et la disparition des *T*. n'est complète que pendant deux jours. Avec 1 milligramme, sur 6 souris traitées, 2 sont guéries (dont une avec une légère rechute le sixième jour) et 4 ont eu des rechutes mortelles (2 le neuvième jour, 1 le dix-septième jour, 1 le trente et unième jour) (2). Avec 0,0025, sur 3 souris traitées, une est guérie définitivement, 1 rechute le neuvième jour, la dernière le seizième jour. Enfin, avec 0,005, 2 souris traitées sont guéries.

Dans le cas de l'acide B, également, nous avons observé l'influence défavorable d'une troisième condensation.

Ainsi le dérivé :

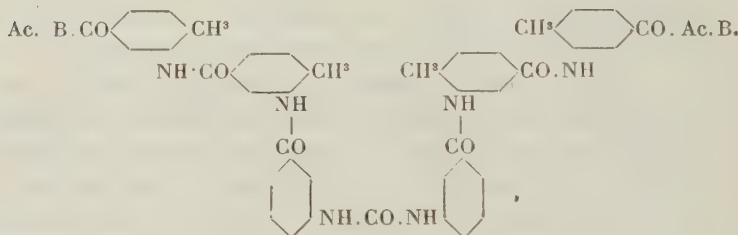
(1) Dans les brevets Bayer on ne trouve qu'une urée dérivée de cet acide, mais il est dit, dans la description, que des dilutions, même étendues, agissent. Le fait même que malgré cette action favorable il ne soit plus question de cet acide dans les brevets montre que Bayer a craint d'attirer l'attention sur cette urée mais il a eu pour conséquence d'éveiller la nôtre.

(2) Il est à noter qu'on observe très rarement des rechutes si lointaines avec l'arsenic.



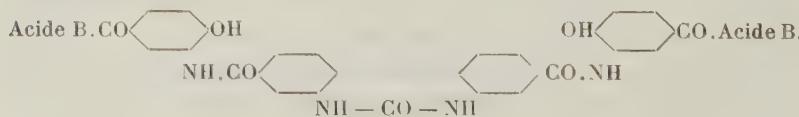
provenant de la condensation successive de trois restes para-méthyl-méta-aminés, n'agit pas, même à 0,005, alors que la dose toxique est voisine de 0,010.

Nous fîmes encore un essai de condensation avec trois noyaux qui confirma d'une façon définitive l'influence néfaste d'une triple condensation; l'acide :



est toxique à la dose de 0,010 et il agit très faiblement à 0,005.

L'introduction d'une fonction phénolique dans l'acide amionbenzoïque n'a pas donné de résultat appréciable; c'est ainsi que la substance :

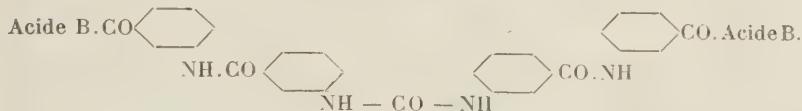


injectée à la dose de 0,01, ne retarde l'infection que de un jour. Par contre, ce produit est très peu toxique, car la souris supporte facilement 0,025.

On remarque donc ici ce qui avait été observé chez les dérivés de l'arsenic, c'est-à-dire l'influence désintoxiquante de la fonction phénolique.

Nous commençons de nouveau à être un peu découragés quand nous eûmes l'idée de reprendre comme base des

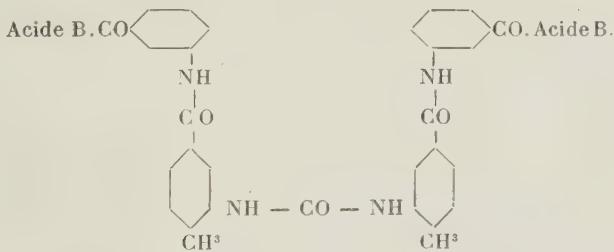
recherches le produit déjà décrit par Bayer : l'urée de l'acide méta-aminobenzoyl-méta-aminobenzoïque



C'est à partir de ce moment que nos recherches prennent une tournure intéressante — palpitable même — et qu'on voit apparaître l'influence tout à fait extraordinaire des moindres modifications de la formule.

La toxicité de ce produit est faible, car la souris supporte facilement 0,012. Avec 0 gr. 00025 on a une prolongation de un jour. Avec 0,001 et 0,002 : guérison.

Ce résultat était très encourageant. Selon toutes les prévisions, l'introduction d'un reste méthylé dans l'urée précédente devait l'améliorer notablement. Plaçons d'abord le reste méthylé sur la partie de la molécule formant l'urée de façon à obtenir le produit suivant :

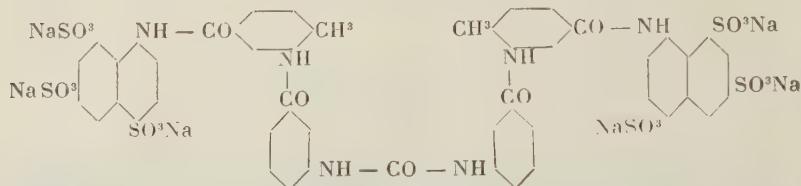


L'amélioration ne s'est pas produite ; d'une part le produit est très毒ique : la souris ne supporte même pas 4 milligrammes et meurt vingt-trois jours après avoir reçu cette dose, et d'autre part 5 milligrammes ne donnent qu'un léger retard. Il faut noter ici l'action toxique à longue échéance ; en effet, avec 0,010 on tue la souris en deux jours ; avec 0,006 en huit jours ; avec 0,005 en neuf jours ; avec 0,004 en vingt-trois jours.

Ce sont ces propriétés physiologiques très curieuses qui rendent si intéressantes les produits de la série du 205.

Méthylons maintenant le premier acide aminobenzoylé, c'est-à-dire opérons d'abord la condensation avec l'acide

p-méthyl-m-aminobenzoïque, puis avec l'acide m-aminobenzoïque :

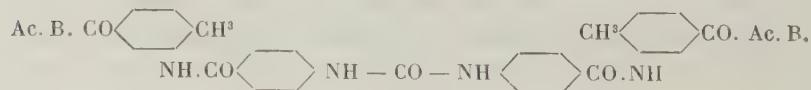


*Cette substance, que nous désignons sous le n° 309, ne différant donc de la précédente que par un simple déplacement d'un reste méthyle, paraît identique au 205.*

Brusquement le coefficient chimio-thérapeutique monte à ces hauteurs signalées pour le 205 Bayer et qui auraient paru fantastiques à Ehrlich. Alors que la souris supporte facilement 0,010, avec 0 gr. 000031 on fait disparaître les *T.* le deuxième jour et la rechute ne se produit que le neuvième; parfois même on observe des guérisons définitives à cette dose. Avec 0,000062, il n'y a pour ainsi dire plus de *T.* vingt-quatre heures après l'injection; les parasites disparaissent après quarante-huit heures et la souris est définitivement guérie. Il en est de même avec des doses de 1/4, 1/2, 1, 5 et 10 milligrammes.  $C/T = 1/160$ .

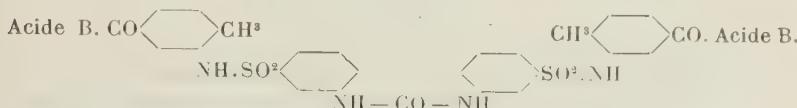
Si nous comparons le 309 au 205, dont nous avons pu, comme nous l'avons dit tout à l'heure, nous procurer une très petite quantité, nous ne pouvons noter la moindre différence; les deux corps agissent identiquement de la même façon. Étant donné tous les résultats négatifs antérieurs, il nous semblerait vraiment surprenant que le 205 ait une autre formule que celle que nous donnons au 309; mais naturellement nous ne pourrions affirmer définitivement l'identité que si nous possédions une quantité suffisante du produit allemand.

Pour illustrer d'une façon encore plus évidente, non seulement l'influence des chaînes latérales, mais aussi celle des positions, nous dirons que l'urée du m-aminobenzoyl-para-méthyl-m-amino-benzoyl :



(par conséquent exactement le 309, si ce n'est que l'acide m-amino-benzoïque est remplacé par l'acide p-aminé), n'agit qu'à la dose presque toxique de 0,010, et encore seulement pour retarder la mort de quelques jours.

Nous avons fait encore bien des essais pour tâcher d'améliorer le 309, mais sans y parvenir. Nous citerons l'urée de l'acide m-aminosulfo-méthyl-m-amino-benzoïque :



qui est, il est vrai, peu toxique. La souris supporte facilement 0,018, mais, quand elle est infectée, 0,010 ne prolongent sa vie que de quelques jours.

### CONCLUSIONS

1° Nous croyons avoir trouvé la véritable formule du 205 Bayer qui ne serait autre que l'urée du méta-aminobenzoyl-para-méthyl mét-a-aminobenzoyl-1-aminonaphtalène-1-sulfonate de sodium-4-6-8. Toutefois, la preuve décisive ne peut être fournie par nous par suite de la difficulté que nous avons rencontrée pour nous procurer une quantité suffisante du médicament allemand.

2° Le 205 appartient à une série de substances des plus intéressantes tant au point de vue biologique que bactériologique. Il ouvre une voie nouvelle et, s'il n'a pas répondu à toutes les espérances que permettaient cependant les recherches de laboratoire, il est certain qu'il jouera un rôle important dans le traitement des trypanosomiases.

3° Le 205 a le grave inconvénient de provoquer des néphrites plus ou moins tenaces. Les recherches doivent être poursuivies dans le but de trouver des substances dépourvues de cette action toxique.

4° Dans la série des urées étudiées par nous, quelques-unes agissent (sur les souris) moins bien que ce 309, mais leur prix de revient est plus bas et il est possible qu'ils soient très actifs sur les grands animaux. C'est le cas de l'urée du mét-a-amino-

benzoyl-méthyl-aminobenzoyl-acide K (le 309 dans lequel l'acide B est remplacé par l'acide K). Nous nous proposons de le faire essayer en Afrique.

## BIBLIOGRAPHIE

### I. — Chimie.

#### Brevets :

D. R. P. 148.505. — *Gesell. f. chem. Ind.*, Bâle, Friedl., 1902-1904, p. 438. Ce brevet, qui est relatif à la préparation de matières colorantes, contient la description de dérivés de l'acide amino-oxy naphtylsulfonique de la forme suivante :  
Ces corps sont, en somme, des urées de la p-phénylène-diamine et de l'acide aminonaphtholsulfonique.  
(Voir Brevet français, n° 297.367 et son brevet d'addition du 16 juillet 1900, Brevet français, n° 309.794.)

D. R. P. 151.017. — *Gesell. f. chem. Ind.*, Bâle, Friedl., 1902-1904, p. 439. Ce brevet a pour objet la préparation de matières colorantes provenant des acides aminoarylaminosulfoniques. Les matières premières sont les produits de condensation du chlorure de nitrobenzoyl ou de l'acetylaminobenzoyl avec les acides aminonaphtholsulfoniques.

D. R. P. 240.827. — *BAYER Friedl.*, 1910-1912, p. 193. Préparation des dérivés aminobenzoylés de l'acide aminobenzoyl-2-amino-5-naphtol-7-sulfonique.

D. R. P. 248.383. — *A. F. G. A.*, Friedl., 1912-1914, p. 443. Obtention de l'urée et de la thiourée provenant de la condensation par le phosgène de 2 mol. de dérivés complexes des acides aminonaphtholsulfoniques.

D. R. P. 252.159. — *BAYER Friedl.*, 1912-1914, p. 225. (Voir également D. R. P. 230.595, vol. X, p. 915.) Obtention des dérivés aminobenzoylés de l'acide aminobenzoyl-2-amino-5-naphtolsulfonique.

D. R. P. 254.510. — *BAYER Friedl.*, 1912-1914, p. 224. Obtention des produits de condensation de la benzidine avec les acides naphtolsulfoniques.

D. R. P. 266.356. — *Chem. Ind.*, Bâle, Friedl., 1912-1914, p. 448, produit de condensation (urée) entre les acides naphtolaminosulfoniques et certains diazos, du type :



D. R. P. 278.122. — *BAYER Friedl.*, 1914-1916, p. 185. Les dérivés aminobenzoylés des acides aminonaphtholsulfoniques, traités par le phosgène dans certaines conditions, fournissent des urées qui ont une action trypanocide.

D. R. P. 284.938. — *BAYER Friedl.*, 1914-1916, p. 186. Dans la préparation des urées décrites dans le brevet 278.122, on peut remplacer les restes aminobenzoïques par les restes aminobenzolsulfoniques.

D. R. P. 288.272. — *BAYER Friedl.*, 1914-1916, p. 189. Dans les brevets précédents, on peut remplacer l'aminobenzol par des acides aminocinnaïques, aminophénylacétiques, aminochlorophénylacétiques, etc.

D. R. P. 288.273. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 191. Les brevets 278.122, 284.938, 288.272 portaient sur les dérivés des acides 1-8-aminonaphthol-sulfoniques. On peut mettre en œuvre également les acides *a* et *b*-naphthylaminosulfoniques qui semblent donner des produits tout aussi intéressants.

D. R. P. 289.107. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 195. Urée de l'acide m-aminobenzoyl-I-amino-8-chloronaphtalène-3-6-disulfonique, etc.

D. R. P. 289.163. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 130. Obtention des urées et thiourées de la série aromatique.

D. R. P. 289.270. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 197. On peut remplacer l'aminobenzoyl par l'aminonaphtoyl et le CO par CS.

D. R. P. 289.271. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 200. A la place de l'acide H, on peut employer un autre acide aminonaphtoldisulfonique, par exemple le 2-amino-8-naphtol-3-6-disulfonique.

D. R. P. 289.272. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 202 (284.938, 288.272, 288.273, 289.107, 289.270, 289.271). Préparation des urées et thiourées de la série naphtalénique. On peut remplacer les acides aminosulfoniques par leurs produits de condensation avec la para-phénylènediamine en présence de phosgène.

D. R. P. 291.351. — BAYER, *Friedl.*, 1914-1916, p. 128. Préparation d'urées et de thiourées de la série aromatique.

## II. — Littérature biologique (1)

1. ANON, « 205 Bayer ». *Ther. Halbmon*, p. 585; *Berl. kl. Woch.*, n° 35, 1920, 15 octobre 1920.
2. ANON, « 205 Bayer ». *Brit. med. Journ.*, 1922, p. 569.
3. BACHMANN, DOIS et OYARZABAL, Bayer 205 und die Behandlung der Infektionskrankheiten, hervorgerufen durch Trypanosoma equinum. *Prensa medica Argentina*, 10 mars 1922.
4. BAERMANN, Die Behandlung der Surra mit Bayer 205. *Beiheft Archiv f. Sch. Tr.*, 26, n° 2, 1922.
5. BAERMANN, Traitement du surra par le 205. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, 27, n° 6, 1923, p. 210.
6. BRUMPT et LAVIER, Mode d'action du 205 Bayer sur divers hématozoaires trypanosomes, piroplasmes, theileries, anaplasmes. *Bull. Soc. Path. exot.*, 15, n° 7, 12 juillet 1922, p. 613.
7. BRUMPT et LAVIER, Un nouveau traité de médecine, fascicule V, maladies infectieuses et parasitaires (fin), 1922, p. 297.
8. DALE, Speech to Royal Institution. (Voir ref. *Brit. med. Journ.*, 1922, 1, mai 1922, p. 807.)
9. ELLINGER, Neue Behandlungsmethode gegen die Beschälseuche der Pferde. *Berl. tier. Woch.*, 1920, p. 492.
10. ELLINGER, Ueber die Heilung des bösartigen Katarrhafiebers des Rindes mit Bayer 205. *Berl. tier. Woch.*, n° 41, 1921, p. 483.
11. FUHRER et PFEILER, Versuche zur Behandlung der Beschälseuche mit Naganol in der Praxis. *Mitteilungen der Tierseuchenstelle des thüringischen Landesamt f. Viehversich. Iéna*, 1, n° 11 et 12, 1920-21.

(1) Pour établir cette bibliographie, nous avons utilisé en grande partie celle qui a paru dans le mémoire de Low et Manson-Bahr.

12. HANDEL et JOETTEN, Ueber chemotherapeutische Versuche mit 205 Bayer, einem neuen Trypanozidenmittel von besonderer Wirkung, aout 1920. *Berl. kl. Woch.*, **57**, p. 821. (Voir *Bull. Inst. Pasteur*, **19**, n° 4, 28 fevrier 1921, p. 431; *Med. Sc. Abst. and Reviews*, **5**, n° 6, mars 1922, p. 519).
13. HAUBOLD, Ueber Erscheinungen und Behandlung der Beschälseuche. *Deut. tier. Woch.*, n° 31, 1922, p. 397.
14. HESSELBACH, Die Trypanozidewirkung von 205 Bayer auf Trypanosom epiperdum. *Centr. f. Bakter.*, 1. Abtlg., **89**, fasc. 4, 1922, p. 48.
15. JENSEN, The cure of sleeping sickness, *Brit. med. Journ.*, n° 3176, 1921, p. 814.
16. KING, 6th annual report of the Soc. of Chem. Ind. (Voir *Brit. med. Journ.*, **1922**, 2, 1922, p. 569).
17. KLEINE et FISCHER, Bericht über Prüfung von Bayer 205 in Afrika. *Deut. med. Woch.*, n° 51, 22 décembre 1922, p. 1693; *Deut. med. Woch.*, aout 1923, p. 1039.
18. LICHTENHELD, Ueber Nagana (Tsetse) und Beschälseuche, insbesondere über Behandlung erkrankter Pferde. *Berl. tier. Woch.*, **161**, 1921.
19. LINÖENBERG, Sur le traitement de la leishmaniose brésilienne par le 205. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **27**, 1923, p. 64.
20. LOW et MANSON-BARR, Preliminary note on the therapeutic action of 205 Bayer in 9 cases of human trypanosomiasis. *Lancet*, 16 décembre 1922, p. 1265.
21. LOW et MANSON-BAHR, The treatment of human trypanosiamis by « Bayer 205 ». *Trans. Roy. Soc. of Trop. Med. et Hyg.*, **16**, n° 7, janvier 1923, p. 339; a) STEVENSON, Note on the pathological changes in the brain of a case of sleeping sickness. *Ibid.*, p. 384; b) WENYON, Note on the trypanosomal action of the serum and cerebrospinal fluid of cases of human trypanosomiasis treated with 205 and on a strain of tr. rhodesiense. *Ibid.*, p. 389; c) THOMSON et ROBERTSON, The action of the urine on a human patient treated with Bayer 205 on a infection of tr. rhodesiense in an experimental animal.
22. MAYER, Ueber intralumbale Behandlung mit Bayer 205 bei Trypanosomenkrankheiten. *Archiv f. Schiffs u. Tropenhygiene*, **25**, n° 12, décembre 1921, p. 375.
23. MAYER, Richtlinien f. die Anwendung von 205 bei trypanosomenkrankheiten. *Archiv f. Sch. et Trop.*, **26**, n° 2, 1922, p. 33.
24. MAYER, Ueber orale Behandlung und Prophylaxie der Trypanosomenkrankheiten mit 205. *Münc. med. Woch.*, **69**, n° 19, 12 mai 1922, p. 702.
25. MAYER, Ueber Resorption und Wirkung des Trypanosomenheilmittels 205 bei innerlicher Behandlung. *Archiv f. Sch. u. Trop.*, **26**, n° 8, aout 1922, p. 237.
26. MAYER, Ueber das neue Trypanosomenheilmittel 205 et seine Bedeutung für die chemotherapeutische Forschung. *Deut. med. Woch.*, 6 octobre 1922, p. 4335.
27. MAYER, Acer del nuevo remedio tripanosomiasico Bayer 205 en el hombre y en los animales. *Rev. med. de Hamburg*, n° 8, 1922.
28. MAYER, Bemerkungen zu der Arbeit : « Ein Fall von einer gewissen « 205 Festigkeit » bei einer von Beschälseuche kranken Stute », von WALTHER et PFEILER, in Nr 14, *Zeit. Deut. tier. Woch.*, n° 23, 1922, p. 287.
29. MAYER et MENK, Ueber die Ausscheidung von Bayer 205 in wirksamer Form im Harn behandelter Menschen und Tiere. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **25**, n° 12, décembre 1921, p. 376.

30. MAYER et MENK, Beitrag z. Behandlung d. Schlafkrankheit mit 205 und dessen Verhalten im menschlichen Körper. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **26**, n° 7, août 1922, p. 208.

31. MAYER et MENK, Ueber Resorption und Wirkung des Trypanosomenheilmittels 205 bei innerlicher Behandlung. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, n° 8, août 1922, p. 237.

32. MAYER, NAST et ZEISS. *Berl. tier. Woch.*, n° 16, 1921.

33. MAYER et ZEISS, Versuche mit einem neuen Trypanosomenheilmittel 205 Bayer bei Menschen et tierpathogenen Trypanosomen. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **24**, n° 9, septembre 1920, p. 257.

34. MAYER et ZEISS, Nuevas investigaciones sobre el Bayer 205 recientemente descubierto para combatir el tripanosoma. *Revista medica di Amburgo*, **2**, n° 5, 1921, p. 147. (Ref. : *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **26**, n° 2, 1921, p. 33.)

35. MAYER et ZEISS, Weiteres über die Wirkung Bayer 205 serum (Menschen-serum). *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **25**, n° 5, juin 1921, p. 149.

36. MAYER et ZEISS, Ueber die Wirksamkeit des Serums mit Bayer 205 vorbehandelter Kaninchen. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **25**, n° 9, septembre 1921, p. 259.

37. MAYER, ZEISS, GIEMSA et HALBERKANN, Weitere Beobachtungen über das Verhalten des neuen Trypanosomenheilmittels Bayer 205 im Blute. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **26**, n° 5, juin 1922, p. 440.

38. MENK, Zur Behandlung der afrikanischen Schlafkrankheit mit 205 Bayer. *Münch. med. Woch.*, n° 1, 5 janvier 1923, p. 18-19.

39. MIESSNER, Bekämpfung der Trypanosomiasen insbesondere der Beschälseuche mit B. 205. *Deut. tier. Woch.*, n° 41, 1922.

40. MIESSNER et BARGE, Chemotherapeutische Versuche mit 205 bei Beschälseuche. *Deut. tier. Woch.*, n° 11, 30 mai 1921, p. 433. (Ref. *Bull. I. P.*, **49**, n° 10, 30 mai 1921, p. 380.)

41. MIESSNER et SCHRAPE, Ein Fall von Pferdepiroplasmose (*Nuttallia equi*) nebst Behandlung mit 205 Bayer. *Deut. tier. Woch.*, n° 47, 1922, p. 617.

42. MIGONE, Die Behandlung des « Mal de Caderas ». *Boletin de la Soc. Ganaderia del Paraguay*, n° 6, 1922.

43. MIGONE et OSUNA, Tratamiento de « Mal de Caderas » de los equideos con al nuevo producto 205 B. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **26**, 1922, p. 289.

44. MOLLOW, Ueber einen Fall von Kala-azar, behandelt mit 205 Bayer, *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **26**, n° 9, octobre 1922, p. 273.

45. MUHLENS et MENK, Ueber Behandlung von menschlicher Trypanosomiasis mit Bayer 205. *Münch. med. Woch.*, **68**, n° 46, 18 novembre 1921, p. 1488.

46. NUTTALL et HADWEN, The successfull drug treatment of canine piroplasmosis together with observations upon the effects of drugs on piroplasma canis. *Parasitology*, **2**, p. 156.

47. OSANA, La cure del « Mal de Caderas ». *Folha medica*, 15 mars 1922.

48. PFEILER, Ueber bisher bei Behandlung der Beschälseuche mit 205 Bayer gemachte Erfahrungen (5). *I. Mitteilungen d. Tierseuchenstelle d. thüringischen Landesamt f. Viehversich.*, Iena, **1**, n° 5, 1920-21. (Ref. : *Centr. f. Bakter. Orig.* **88**, p. 53.)

49. PFEILER, Prophylaxie der Beschälseuche (8). *Ibid.*, n° 8, 1920-21.

50. PFEILER, Kasuistische Mitteilungen über ein anscheinendes Versagen der Bayer 205 Behandlung bei an natürlicher Beschälseuche leidenden Pferden. *Centr. f. Bakter., Orig.* **88**, n° 1, 14 mars 1922, p. 48.

51. PRÖSCHOLDT, Versuche mit « 205 » und « Bayer 1037 » gegen Hämaglobinurie der Rinder. *Deut. tier. Woch.*, **30**, n° 47, 1922, p. 613.

52. RODENWALDT et DOUWES, Sur l'emploi du 205 dans le traitement du surra des chevaux aux Indes néerlandaises. *Archiv f. Sch. u. Tr.-Hyg.*, **27**, 1923, p. 305.

53. RUPPERT, Sur les modifications du quotient chimiothérapeutique suivant l'espèce animale. *Archiv f. Sch. u. Tr.-Hyg.*, **27**, 1923, p. 273.

54. SALFELDER, Epidemiologische und klinische Beobachtungen sowie chemotherapeutische Versuche bei der in Thüringen in den Jahren 1919-1921 herrschender Beschälseuche der Pferde. *Dissertation der tierärztl. Hochschule*, Leipzig, 1922.

55. SCHRAPE, Zur Behandlung dourinekranker Tiere mit 205. *Dissertation der tierärztl. Hochschule zu Hannover*, 1921.

56. VON SCHUCKMANN, Ueber die Einwirkung von 205 Bayer auf Trypanosomen ausserhalb des Tierkörpers. *Centr. f. Bakt., Orig.* **86**, n° 6, 8 juillet 1921, p. 485.

57. SCHWARZEL, Behandlungsversuche mit 205 bei der ansteckenden Blutarmut der Pferde. *Mon. f. prakt. Tierheilkunde*, n° 2, 1921.

58. SEI (SHIGEMOTO), Action du 205 sur le sang. *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **27**, n° 4, 1923, p. 130.

59. SEI (SHIGEMOTO), Recherche du 205 Bayer dans les organes. *Ibid.*, 1923, p. 257.

60. STEFFAN, Morphologische Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Heilmittel auf Trypanosomen. *Zeit f. Hyg.*, **96**, fasc. 3, 1922.

61. STEPHENS et YORK, A case of sleeping sickness (*T. gambiense*) treated by 205 Bayer. *Annals of Trop. Med. a. Paras.*, **16**, n° 4, 1922, p. 421.

62. STEPPUHN, ZEISS et BRYCHONENKO, Recherches biochimiques sur le 205 Bayer (communication préalable). *Archiv f. Sch. u. Tr.*, **27** (1923), n° 6, p. 206.

63. WALThER et PFEILER, Ein Fall einer gewissen 205 Festigkeit bei einem von Beschälseuche krankem Pferde. *Deut. tier. Woch.*, n° 14, 1921, p. 185.

64. WALThER et PFEILER, Ein Fall von einer gewissen 205 Festigkeit bei einer von Beschälseuche kranker Stute. *Deut. tier. Woch.*, n° 14, 1922, p. 173.

65. WEICHBRODT, « Bayer 205 », *Berl. klin. Woch.*, n° 2, 1<sup>er</sup> octobre 1921, p. 34. (Ref. : T. D. B., février 1922, **19**, n° 2, p. 133.)

66. WENYON, The action of Bayer 205 on trypanosoma equiperdum in experimentally infected mice. *Brit. med. Journ.*, 5 novembre 1921, p. 746.

67. YORKE, The treatment of a case of Rhodesian sleeping sickness by the praparation known Bayer 205. *Annals of Trop. Med. a. Parasit.*, **15**, n° 4, 28 mai 1921, p. 479.

68. YORKE, The search for specific Remedies. *Brit. med. Journ.*, 20 mai 1922, p. 807.

69. YORKE, Bayer 205. *Brit. med. Journ.*, 23 septembre 1922, p. 569.

**LA RÉACTION AU *B. COLI***  
**APPLIQUÉE A L'ÉTUDE DE LA PROTÉOLYSE SÉRIQUE**  
**(« FERMENTS DE DÉFENSE » D'ABDERHALDEN)**

par

E. WOLLMAN, V. LABERNADIE,  
M<sup>me</sup> E. WOLLMAN et M<sup>me</sup> J. OSTROWSKI.

D'après Abderhalden et son école la pénétration dans le sang de toute albumine qui lui est normalement étrangère a pour effet la production ou la mobilisation de ferments spécialement dirigés contre cette albumine et qui, en la détruisant, contribueraient à maintenir l'intégrité du milieu intérieur.

On conçoit tout l'intérêt que devaient susciter, parmi les biologistes et les médecins, de pareilles constatations. En dehors de l'importance que pouvait avoir, pour la compréhension de l'immunité, ce moyen de lutte de l'organisme, la rapidité d'apparition et la spécificité exquise de ces *ferments de défense* semblaient devoir fournir une base à des procédés de diagnostic précis et sensibles dans les états physiologiques et pathologiques les plus divers. Malheureusement, il faut constater que si peu de questions ont provoqué des recherches aussi nombreuses et des controverses aussi passionnées, il n'y en a guère où les résultats obtenus restent aussi incertains et contradictoires.

Une partie des chercheurs confirment la spécificité remarquable des ferments de défense et la très grande importance pratique des procédés de diagnostic basés sur leur recherche. D'autres, aussi nombreux, refusent toute valeur à ces réactions et nient la spécificité, ou même l'existence, de ces ferments.

Une seule conclusion se dégage avec netteté de l'ensemble des travaux publiés : c'est que les méthodes employées, et tout

particulièrement celle dite *de la dialyse*, sont improches à éliminer les erreurs d'interprétation et à fournir, entre les mains des différents expérimentateurs, des résultats comparables. Il nous avait semblé, dans ces conditions, qu'il y avait intérêt à reprendre l'étude de cette question à l'aide de la méthode simple qu'est la *réaction au B. coli*.

### I. — Historique et état actuel de la question des « ferments de défense ».

C'est à Delezenne que revient le mérite d'avoir, pour la première fois, mis en évidence l'action protéolytique du sérum sanguin, milieu connu jusque-là par ses propriétés antitryptiques. Cet auteur avait tout d'abord observé que le pouvoir gélatinolytique du sérum de chien, nul ou à peine marqué chez l'animal normal, semblait augmenter à la suite d'injections de gélatine (1). Peu de temps après, Delezenne et Pozerski (2) observent ce fait remarquable que le sérum sanguin de l'homme et de certains animaux, particulièrement du chien, normalement antilryptique, acquiert la propriété de digérer la gélatine et la caséine (mais non l'ovalbumine) à la suite du traitement par le chloroforme.

Quelques années plus tard, Abderhalden et ses collaborateurs entreprennent des recherches systématiques sur le pouvoir peptolytique et protéolytique des humeurs et des tissus (3). Ils constatent que les éléments figurés du sang, leucocytes, hématies et plaquettes, sont doués, chez les diverses espèces étudiées à ce point de vue, d'une action peptolytique prononcée. Quant au plasma (ou sérum) sanguin les résultats varient suivant les espèces et les polypeptides considérés. C'est ainsi que le plasma (ou sérum) de cheval et de bœuf sont à peu près inactifs vis-à-vis de la glycyl-l-tyrosine. Il en est de même pour le plasma de chien lequel attaque, pourtant, la diglycyl-glycine. Le plasma de lapin, par contre, digère énergiquement le premier dipeptide.

(1) E. METCHNIKOFF, *L'immunité dans les maladies infectieuses*, chap. V, p. 414. Masson et Cie, Paris, 1901.

(2) C. R. Soc. Biol., 55, p. 329 et 690.

(3) Zeitschr. f. physiol. Chemie, 51, p. 334; 53, p. 230 et 294; 55, p. 371 et 377.

Poursuivant ces recherches Abderhalden et Pincussohn (1) observent un fait analogue à celui déjà constaté par Delezenne et que nous avons rapporté plus haut : le pouvoir d'attaquer la glycyl-l-tyrosine, constant pour le sérum normal de chien, augmente à la suite d'injections massives de sérum de cheval ou de blanc d'œuf. On injecte, par exemple, à plusieurs reprises, 40 à 50 cent. cubes de ces protéines (280 cent. cubes en tout) à l'animal et on saigne celui-ci une heure ou plusieurs jours après la dernière injection. On mélange 1 gramme de glycyl-l-tyrosine à 10 cent. cubes de plasma et on recherche, après trois jours de séjour à l'étuve à 37°, les quantités présentes du polypeptide employé et de ses constituants. Les résultats, assez variables du reste, montrent qu'on retrouve, en moyenne, plus de dipeptide non modifié dans les expériences avec le plasma normal que dans celles faites avec le sang d'animaux traités. C'est ainsi que les quantités de glycyl-l-tyrosine retrouvées variaient, avec le plasma normal, de 0 gr. 56 à 0 gr. 86, et de 0 gramme à 0 gr. 70 avec celui d'animaux préparés : il y aurait attaque quelque peu plus rapide dans ce dernier cas.

Ces résultats furent étendus au cas d'animaux préparés par des injections de peptone (2). En suivant au polarimètre les variations du pouvoir rotatoire des mélanges : plasma normal + peptone et plasma d'animal traité + peptone, on constatait une attaque plus marquée dans ce dernier cas.

Se basant sur le fait que la peptolyse ne se fait plus après un chauffage à 60°, Abderhalden l'attribue, comme Delezenne l'avait déjà fait pour la protéolyse avant lui, à l'action de *ferments*.

Jusqu'ici les faits observés ne présentent rien de très inattendu, ni qui doive surprendre. Etant donné la présence de ferments protéolytiques et peptolytiques dans les leucocytes, les hématies et même, d'après Abderhalden, dans les plaquettes, on conçoit que la teneur du sang en ces ferments puisse augmenter à la suite de toute intervention s'accompagnant d'une altération des éléments figurés du sang. Par contre, rien dans les résultats que nous venons de rapporter ne semble justifier

(1) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 61, p. 200.

(2) *Ibid.*, 62, p. 120 et 243.

les hypothèses et les généralisations dont ils deviennent le point de départ.

Dès ce moment, en effet, Abderhalden se demande si l'organisme ne répondrait pas, par la production de ferments *spécifiques*, à l'introduction de toute substance étrangère à la composition normale du plasma sanguin. Dès ce moment, aussi, il envisage la possibilité d'expliquer ainsi les processus importants de l'immunité et de l'anaphylaxie et d'appliquer la recherche des ferments spécifiques au diagnostic des états cliniques les plus variés : grossesse, tumeurs, insuffisances organiques, maladies infectieuses.

Ces espoirs ne semblaient pas devoir survivre à l'épreuve des premières expériences d'orientation : *les ferments qui apparaissent dans le sang à la suite d'introduction parentérale des diverses substances sont dénués de spécificité au sens ordinaire du mot* (1). C'est ainsi que le plasma d'un animal traité par des injections d'une albumine donnée attaque non seulement cette albumine et ses dérivés, mais aussi les substances protéiques les plus diverses ; il serait inactif, toutefois, vis-à-vis des graisses et des hydrates de carbone : il y aurait spécificité de groupe.

Abderhalden ne se laisse pas arrêter par ces constatations. Il est séduit par la simplicité relative avec laquelle les choses se présentent dans la grossesse où la confrontation avec les données cliniques devait permettre d'être rapidement fixé sur la valeur de la méthode. Schmorl et Veit avaient montré que les cellules de revêtement des villosités choriales envahissaient fréquemment la circulation de la mère : n'y produiraient-elles pas, contre toute attente, des ferments protéolytiques spécifiques pour le tissu placentaire ?

Les premières recherches furent effectuées à l'aide de la méthode optique mentionnée plus haut : on déterminait au polarimètre les variations du pouvoir rotatoire d'un mélange de peptone, de placenta et de sérum de femme normale ou enceinte. Les résultats dépassèrent toutes les prévisions : seul le sérum gravide faisait varier le pouvoir rotatoire, celui des mélanges contenant du sérum normal restant constant, même après un contact de plusieurs jours à l'étuve à 37°; d'autre

(1) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 64, p. 100.

part, le sérum gravide, lui aussi, devenait inactif après chauffage à 60° (1). L'activité de ce sérum devait donc être attribuée à la présence de ferments attaquant la peptone de placenta, et qui manquent au sérum normal. La réaction de la grossesse était réalisée.

Toutefois la méthode optique présente de très grandes difficultés, tant au point de vue de la préparation d'une peptone convenable qu'à celui de la détermination des résultats. Dans le cas de réaction positive les variations du pouvoir rotatoire peuvent ne pas dépasser 0°05. Il faut, pour les saisir, posséder un appareil excellent et être très exercé dans son maniement; d'autre part il n'est pas facile de régler exactement la fabrication d'une peptone dont l'hydrolyse se traduise par des variations utilisables du pouvoir rotatoire. Pour toutes ces raisons Abderhalden cherche une méthode plus pratique.

Etant donné la cause qui détermine l'apparition des ferments dans le sérum gravide (pénétration des cellules syncytiales), celui-ci doit attaquer non seulement les peptones, mais aussi les albumines placentaires. On pourra déceler cette digestion en recherchant les produits dialysables. A cet effet Abderhalden se sert de dialyseurs en vessie natatoire de poisson dans lesquels on introduit le sérum à examiner et un morceau de tissu placentaire privé au préalable de produits dialysables par une série de lavages à chaud. Les dialyseurs sont ensuite placés dans de l'eau distillée dans laquelle on recherchera les produits dialysables de la digestion à l'aide de la réaction du biuret (2).

Cette nouvelle *méthode de la dialyse* a donné entre les mains d'Abderhalden et de ses collaborateurs des résultats non moins remarquables que ceux obtenus par la méthode optique : au cours de nombreux examens, seuls les sérum de femmes enceintes ont donné, dans les conditions indiquées, une réaction du biuret positive; cette réaction devenait négative lorsque les sérum avaient subi auparavant un chauffage à 60°. Fait intéressant, des résultats analogues ont pu être obtenus expérimentalement : en traitant des animaux (chiens, cobayes, lapins) par des injections de protéines placentaires on obtient un sérum

(1) *Ergebnisse der Geburtshilfe u. Gynäkologie*, 2, p. 367.

(2) *Zeitschr. f. physiol. Chemie*, 77, p. 249.

actif contre ces protéines; le sérum normal, lui, est dépourvu de toute action.

Encouragé par ces résultats, Abderhalden fait étendre les recherches dans les directions les plus diverses, et c'est, dans tous les domaines, une véritable pêche miraculeuse. Nous venons de rappeler les résultats obtenus dans la grossesse par Abderhalden lui-même et par ses collaborateurs immédiats. De nombreux auteurs en apportent une confirmation éclatante : la concordance entre les données du laboratoire et celles de la clinique serait, pour la grossesse, à peu près absolue (1). Il en est de même ailleurs.

Fauser et ses élèves appliquent avec succès la méthode de la dialyse au diagnostic différentiel de la démence précoce et des psychoses du type de la manie dépressive. Le sérum des malades atteints de démence précoce attaque les tissus des glandes sexuelles; celui des malades du second groupe est inactif (2).

Lampé et ses collaborateurs s'attachent à l'étude des maladies dystrophiques. Ils affirment que le sérum de basedowiens, par exemple, attaque toujours le tissu thyroïde provenant de malades atteints de goitre exophthalmique, rarement le tissu thyroïde normal. L'ovaire et le thymus sont attaqués dans une certaine proportion des cas alors que les résultats sont toujours négatifs avec les autres organes (3). De même, le sérum de myxœdémateux, ainsi que celui de malades atteints de goître endémique, n'attaque que le tissu thyroïde, à l'exclusion de tout autre (4).

Des résultats intéressants sont obtenus également dans le diagnostic des tumeurs. Les propriétés protéolytiques du sérum se montreraient ici d'une spécificité étroite : les sérum de carcinomateux n'attaqueraient que le tissu de tumeurs épithéliales, ceux de sarcomateux n'étant actifs que contre les tumeurs conjonctives (5).

Enfin, des résultats très encourageants sont rapportés par

(1) *Münch. med. Woch.*, **60**, p. 1139 et 1427.

(2) *Münch. med. Woch.*, **60**, no 11; *Ibid.*, p. 1197 et 1984.

(3) *Münch. med. Woch.*, **60**, p. 1533.

(4) *Münch. med. Woch.*, **60**, p. 2112.

(5) *Münch. med. Woch.*, **60**, p. 1644; *Ibid.*, **61**, p. 1386.

Abderhalden et Andryewsky en ce qui concerne le diagnostic de la tuberculose. Ici encore, la spécificité est remarquable, le sérum de bovidés tuberculeux, par exemple, n'attaquant que les bacilles du type bovin (1).

La nouvelle méthode semblait donc autoriser tous les espoirs. Les recherches se multiplient avec une rapidité dont l'histoire de la science offre peu d'exemples. Mais alors que les unes confirment et étendent le rôle de la réaction d'Abderhalden, d'autres aboutissent à des résultats très différents et lui déniennent même toute valeur. Le désaccord paraît irréductible. Il ne peut être question ici de citer tous ces travaux qui se chiffrent par centaines : quelques exemples choisis dans les différents domaines suffiront à montrer la contradiction qui y règne.

#### A. — DIAGNOSTIC DE LA GROSSESSE.

Freund et Brahm (2) examinent par la méthode optique et celle de la dialyse 135 sérum. Sur les 134 cas étudiés par la méthode optique, 97 ont donné des résultats concordants avec la clinique (= 72,4 p. 100). Cette concordance a été de 66,7 p. 100 pour la méthode de la dialyse.

Gambaroff (3) constate une concordance parfaite :

22 sérum gravides donnent tous une réaction positive.

10 sérum normaux sont tous négatifs.

Mosbacher et Port (4) examinent 50 sérum gravides avec 35 résultats positifs, 5 douteux et 10 négatifs. Pour 25 sérum de femmes normales la réaction a été positive 7 fois, douteuse 11 fois et négative 7 fois. Enfin, 25 sérum d'homme ont donné 14 réactions positives, 9 négatives et 2 douteuses. D'après Lampé et Fuchs (5), on ne trouve jamais de ferments attaquant le placenta dans le sérum humain normal.

M<sup>me</sup> Sabin (6) a examiné 72 sérum; sur 43 réactions positives, 39 furent confirmées par la clinique; les 16 réactions négatives l'ont été toutes. Des résultats moins satisfaisants ont été

(1) *Ibid.*, 60, p. 1641.

(2) *Ibid.*, 60, p. 685.

(3) *Ibid.*, p. 1651.

(4) *Deut. med. Woch.*, n° 28, 1914.

(5) *Ibid.*, p. 747.

(6) *La Presse Médicale*, p. 1015, 1913.

obtenus par Daunay et Ecale (1). Tous les sérum (24) de femmes enceintes examinés ont donné des réactions plus ou moins intenses. Mais de telles réactions ont pu également être observées avec du sérum provenant de femmes non enceintes (3 cas).

Allmann (2) obtient des réactions positives dans tous les cas (48) de grossesse confirmée, et des réactions négatives avec tous les sérum (22) provenant de femmes non enceintes.

Enfin, Abderhalden, lui-même, annonce, pour une série d'examinens portant sur plusieurs centaines de cas, une concordance absolue avec la clinique. Il n'hésite pas à affirmer que les résultats obtenus avec la méthode de la dialyse dans le diagnostic de la grossesse sont une pierre de touche de l'habileté d'un expérimentateur. Nul ne devrait entreprendre des recherches originales à l'aide de cette méthode sans s'être assuré, auparavant, que sa technique lui permet d'obtenir des résultats corrects, pour 100 p. 100 environ des cas, dans le diagnostic de la grossesse (3).

On voit assez, par ces exemples, le désaccord qui règne entre les expérimentateurs quant à la valeur de la réaction d'Abderhalden dans la grossesse. Pourtant, aucun des auteurs cités ne met en doute l'intérêt théorique, ni même pratique, de cette réaction. Il n'en est plus de même de Werner et von Winiwarter (4) et surtout de L. Michaelis et von Lagermarck (5). Les uns et les autres dénient à la réaction toute valeur.

Le travail de Michaelis et von Lagermarck mérite une mention spéciale, car il a beaucoup contribué au revirement de l'opinion vis-à-vis de la réaction de la grossesse.

En suivant minutieusement toutes les indications d'Abderhalden ces auteurs n'ont pu constater aucune différence constante entre le pouvoir protéolytique du sérum gravide et celui du sérum normal de femme ou d'homme. Michaelis et von Lagermarck insistent, d'autre part, sur certaines causes d'erreur dans la technique d'Abderhalden qui peuvent expliquer en

(1) *C. R. Soc. Biol.*, p. 1190, 1913.

(2) *Deut. med. Woch.*, p. 271, 1914.

(3) ABDERHALDEN. *Abwehrfermente des tierischen Organismus*, 3<sup>e</sup> édition, p. 133. Berlin, 1913.

(4) *Wien. klin. Woch.*, n° 45, 1913.

(5) *Deut. med. Woch.*, 40, p. 316.

partie, tout au moins, les résultats favorables obtenus par la plupart des auteurs (1). Nous reviendrons sur ce point plus loin, lorsque nous étudierons cette technique en détail.

### B. — DIAGNOSTIC DES TUMEURS.

Les données des différents auteurs sont ici aussi contradictoires que pour le diagnostic de la grossesse. Nous avons cité plus haut quelques travaux dont les résultats apparaissent comme à peu près parfaits au point de vue de leurs concordance avec la clinique. D'autres chercheurs ont été moins heureux.

Kammerer, Clausz et Dietrich (2) obtiennent les résultats les plus contradictoires : action variable sur le tissu cancéreux aussi bien de sérum de carcinomateux que de sérum normal. Il en est de même pour Fränkel (3).

D'après Oeller et Stephan (4), tout en suivant scrupuleusement la technique d'Abderhalden, on ne réussit pas à mettre en évidence des ferments protéolytiques pour un certain nombre de sérum de carcinomateux. Lorsque de tels ferments existent, ils ne sont pas spécifiques, le placenta et le sarcome étant attaqués par le sérum de malades atteints de tumeurs épithéliales en même temps que le tissu carcinomateux. De même que Michaelis et von Lagermarck, ces auteurs insistent sur les nombreuses causes d'erreur dont se trouve entachée la méthode de la dialyse.

Œttinger, Fiessinger et Marie (5) n'obtiennent des réactions positives que pour les deux tiers environ des sérum de cancéreux examinés. Par contre, Benech (6) constate une concordance parfaite avec les données cliniques : réaction positive avec l'ensemble des sérum cancéreux examinés (20), réaction

(1) Il est intéressant de faire remarquer que la rédaction de la *Deutsche medizinische Wochenschrift* croit devoir justifier, dans une note, l'insertion de ce travail, « dont les résultats, contraires à ceux obtenus par de nombreux auteurs dans les domaines les plus divers du diagnostic médical, ne sauraient être considérés comme significatifs ».

(2) *Münch. med. Woch.*, 61, p. 469.

(3) *Deutsch. med. Woch.*, n° 12, 1914.

(4) *Münch. med. Woch.*, 61, p. 579.

(5) *Bull. Soc. méd. des Hôp.*, 37, p. 962.

(6) *C. R. Soc. Biol.*, 76, p. 361.

négative pour tous les sérum (25) non cancéreux. Des résultats aussi favorables sont rapportés par Kotschnéff et Shingarewa (1). Enfin, Doyen et Takamine (2) confirment la valeur de la réaction dans le sarcome; les résultats seraient moins bons pour le cancer épithéial.

### C. — DIAGNOSTIC DES TROUBLES ORGANIQUES.

Dès qu'un organe cesse de fonctionner normalement ses cellules déversent dans le sang, d'après Abderhalden, des substances qui y sont normalement étrangères. L'organisme réagit en produisant des ferments spécifiques dont la présence permet de diagnostiquer le trouble organique. Nous avons mentionné plus haut les recherches de Fauser sur la démence précoce, celles de Lampé sur les goitres exophthalmique et endémique. On conçoit l'enthousiasme avec lequel les cliniciens accueillirent ces faits reproduits, du reste, par de nombreux chercheurs. On ne saurait ne pas être impressionné, par exemple, par des résultats comme ceux de Wegener (3). Cet auteur a examiné, par la méthode de la dialyse, un nombre considérable de sérum provenant de personnes normales ou atteintes de troubles divers. Le tableau ci-dessous résume une partie de ces recherches.

NATURE DES CAS ÉTUDIÉS	NOMBRE des cas	RÉSULTATS (organes attaqués par le sérum)
1. Hystérie simple . . . . .	32	Aucun organe.
2. Démence précoce . . . . .	96	Testicule ou ovaïre; cervelle.
3. Neurasthénie . . . . .	11	Substance nerveuse; quelquefois musculaire.
4. Pneumonie ; tuberculose pulmonaire . . . . .	8	Poumon.
5. Alcoolisme . . . . .	8	Foie; dans les psychoses alcooliques, cervelle.
6. Epilepsie . . . . .	61	Aussitôt après l'accès et pendant 8 jours, cervelle; dans l'intervalle des accès, aucun organe.
7. Personnes normales . . . . .	43	Aucun organe.

(1) *Ibid.*, p. 354.

(2) *Ibid.*, 77, p. 315.

(3) *Münch. med. Woch.*, 61, p. 45.

Tous les auteurs sont loin d'enregistrer de tels succès. Dirnitz et Fries (1) échouent dans leurs tentatives d'appliquer la réaction d'Abderhalden au diagnostic différentiel de la démence précoce ; les résultats qu'ils obtiennent dans l'épilepsie sont des plus contradictoires. D'après ces auteurs la réalité ne répond guère aux espoirs fondés sur la nouvelle réaction. Bisgaard et Kossbjerg (2) aboutissent à des conclusions analogues : la recherche des ferments spécifiques ne présente, d'après eux, aucun intérêt en psychiatrie.

#### D. — RECHERCHES EXPÉRIMENTALES.

On pouvait s'attendre à des résultats plus univoques sur le terrain expérimental : il n'en est rien.

Frank, Rosenthal et Biberstein (3) injectent à des lapins de l'albumine d'œuf ou du rein de mouton broyé et mis en suspension. Le sérum des animaux traités par cette dernière substance acquiert des propriétés protéolytiques non seulement vis-à-vis du rein du mouton, mais aussi vis-à-vis du foie de cet animal, et, surtout, du placenta humain : l'action n'est pas spécifique. On ne constate pas d'augmentation appréciable du pouvoir protéolytique à la suite du traitement par le blanc d'œuf.

D'après Fuchs (2), au contraire, les ferments protéolytiques qui apparaissent chez l'animal à la suite du traitement par une substance déterminée sont doués d'une spécificité remarquable, mais d'un ordre particulier, analogue à celle que les immunologistes ont reconnu pour le cristallin. Le sérum d'animaux préparés par des injections de tissu rénal humain, par exemple, digérera non seulement le rein humain, mais aussi celui de lapin, de cobaye, de veau. De même le sérum de lapin traité avec du tissu hépatique exercera une action protéolytique sur le foie des différentes espèces, à l'exclusion de tout autre organe.

Des résultats analogues ont été notés par Dejust (4) et par Schlimpert et Issel (5) dont les observations ont porté sur la

(1) *Wien. klin. Woch.*, **43**.

(2) *Deut. med. Woch.*, **40**, n° 27.

(3) *Münch. med. Woch.*, **60**, p. 1594.

(4) *C. R. Soc. Biol.*, **76**, p. 472.

(5) *Münch. med. Woch.*, **90**, p. 1758.

grossesse chez les animaux. Le premier de ces auteurs constate que le sérum de chienne normale n'a aucune action sur le placenta alors que le sérum de chienne gravide attaque non seulement le placenta homologue, mais aussi le placenta humain. D'après Schlimpert et Issel, les sérums de jument et de brebis gravides attaquent non seulement le placenta de ces espèces, mais aussi le placenta de femme. Inversement, le sérum de femme enceinte attaque le placenta de jument et cela avec plus d'intensité que pour le placenta homologue, d'où avantage à employer le placenta de jument dans les cas de réaction douteuse.

Enfin, Abderhalden et Schiff (1) étendant leurs recherches aux animaux constatent également, dans la grossesse, une protéolyse spécifique : le sérum de lapine pleine agit sur le placenta, à l'exclusion de tout autre organe.

Voelkel (2), ainsi que Fekete et Gal (3), observent l'apparition de ferments spécifiques chez les animaux immunisés contre des bactéries (*B. coli* et *B. typhique*).

Par contre, la spécificité est formellement niée par Heilner et Petri (4). Ces auteurs provoquent un hématome sous-cutané chez le lapin et constatent que le sang prélevé quelques heures plus tard devient protéolytique pour différents organes alors qu'il était sans action avant l'intervention. C'est par un mécanisme analogue que s'expliqueraient, d'après Heilner et Petri, les phénomènes observés dans la grossesse. Abderhalden et Schiff (*loc. cit.*) opposent à ces expériences l'observation suivante faite sur l'homme : dans un cas d'écrasement musculaire, avec épanchement sanguin, le sérum du patient exerçait une action protéolytique marquée sur le tissu musculaire, mais non sur ceux du foie ou du placenta.

On voit, par ce qui précède, combien sont contradictoires les résultats obtenus par des expérimentateurs souvent également habiles et consciencieux et combien l'incertitude reste grande, malgré des centaines de travaux, quant au rôle ou même à l'existence des ferments protéolytiques spécifiques du sang.

(1) *Münch. med. Woch.*, 60, p. 2230.

(2) *Ibid.*, 61, p. 349.

(3) *Monat. f. Geburtsh.*, 39.

(4) *Münch. med. Woch.*, 60, p. 1530.

Un tel état de choses n'était pas fait pour encourager les chercheurs, ni surtout les praticiens et la réaction d'Abderhalden fut de plus en plus délaissée. Alors qu'on trouve plus de cent cinquante articles (travaux originaux, revues et analyses) consacrés à cette réaction dans la *Münch. med. Wochenschrift* pour 1914, il n'y en a plus que trois en 1922 (1). Même en laissant de côté le fond même de la question, à savoir l'exactitude des idées et des observations d'Abderhalden, on se rend compte qu'il n'en pouvait pas être autrement quand on considère les irrégularités et les causes d'erreur inhérentes à la technique employée.

## II. — Causes d'erreur dans la méthode de la dialyse.

Nous avons mentionné plus haut les difficultés (de préparation de peptone et de lecture) auxquelles se heurte la méthode optique et qui font qu'elle a dû céder le pas à la méthode de la dialyse. Nous ne nous occuperons donc ici que de cette dernière.

Nous avons rappelé déjà le principe de cette méthode, fort simple, mais dont la réalisation se heurte dans la pratique à de très grandes difficultés. Abderhalden a, du reste, cherché à perfectionner la technique en améliorant les dialyseurs et en remplaçant la réaction du biuret, peu sensible, par celle à la ninhydrine (tricétohydrindène) dans la recherche des produits dialysables de la digestion. Telle qu'elle est actuellement pratiquée, la méthode de la dialyse présente trois sources principales d'erreur tenant aux propriétés des dialyseurs, à la préparation des tissus soumis à la protéolyse, aux réactifs employés. Nous allons examiner de plus près chacun de ces points.

### A. — CAUSES D'ERREUR TENANT A L'EMPLOI DES DIALYSEURS.

Les dialyseurs doivent remplir les deux conditions suivantes : être imperméables aux albumines et perméables aux produits dialysables de la digestion de celles-ci : peptones, polypeptides, acides aminés.

(1) L'un de ceux-ci maintient, du reste, la valeur très grande de la réaction d'Abderhalden dans le diagnostic de la grossesse à condition d'y introduire une notion quantitative.

Des dialyseurs spéciaux, préparés en vue de la réaction d'Abderhalden, ont été mis dans le commerce ; ils sont censés satisfaire à ces deux conditions. Leur vérification, toutefois, reste obligatoire et cela non seulement au début des expériences, mais aussi à intervalles rapprochés au cours de celles-ci, la perméabilité pouvant varier avec le temps et, surtout, à la suite des manipulations auxquelles les dialyseurs sont soumis : lavages, brossage et surtout stérilisation.

La vérification de l'imperméabilité aux albumines présente, dans la pratique, une importance secondaire, les dialyseurs envisagés satisfaisant, en général, à cette condition. Toutefois, déjà ici, nous rencontrons une cause d'erreur sur laquelle Michaelis a le premier attiré l'attention et qui peut, le cas échéant, conduire à une fausse interprétation des résultats. Dans la technique habituelle on vérifie l'imperméabilité aux albumines de la façon suivante : on introduit dans le dialyseur 2 c. c. 5 de blanc d'œuf dilué et on le porte dans un petit récipient contenant 20 cent. cubes d'eau distillée stérile. Le contenu du dialyseur et du récipient est recouvert d'une couche de toluène et le tout porté à l'étuve. Au bout de seize heures, on recherche l'albumine dans le liquide extérieur à l'aide de la réaction du biuret. Or, à la limite, la teinte bleue-violette caractéristique est très difficile à apprécier et à distinguer de la teinte bleue du réactif. Admettons que l'on ait trouvé une réaction positive dans un cas où elle ne devait pas l'être. On sera tout naturellement amené à vérifier à nouveau la perméabilité à l'albumine du dialyseur employé ; étant donné la difficulté d'interpréter le résultat de la réaction du biuret à sa limite on pourra, à tort, attribuer au passage de l'albumine le résultat observé.

La perméabilité des dialyseurs aux produits de la digestion joue un rôle autrement important. Pour que les résultats soient comparables il faut n'employer que des dialyseurs d'une perméabilité rigoureusement la même. Dans la pratique on vérifie cette perméabilité de la façon suivante. On introduit dans les dialyseurs 5 cent. cubes d'une solution de peptone à 0,5 ou à 1 p. 100 et on recherche la peptone dans le liquide extérieur, après seize heures de dialyse, à l'aide de la réaction de la ninhydrine. L'intensité de la réaction étant fonction de

la concentration des substances actives, des précautions minutieuses sont prescrites pour que l'évaporation se fasse uniformément pendant la dialyse et surtout pendant l'ébullition avec la ninhydrine. Dans la pratique toutes ces précautions se montrent illusoires.

Les dialysats obtenus avec les solutions de peptone habituellement employées donnent avec la ninhydrine une coloration violette intense qui masque complètement les faibles différences tenant à une perméabilité inégale des dialyseurs. Or, étant donné les très petites quantités de substances dialysables produites dans la réaction d'Abderhalden, des différences minimes de perméabilité suffisent pour en fausser les résultats. Lange (1) recommande de n'employer, pour l'épreuve de la perméabilité, que des solutions de peptone très étendues, à 0,1 p. 100 par exemple, permettant de déceler des différences de perméabilité qui échappent totalement avec la technique habituelle.

Même lorsque toutes les précautions ont été prises pour choisir des dialyseurs également perméables, on n'est pas à bout de difficultés. A chaque expérience, ces dialyseurs sont stérilisés par ébullition, ce qui modifie leur perméabilité. Il suffit donc que certains d'entre eux aient été employés plus fréquemment que d'autres pour que la perméabilité devienne inégale. Cette difficulté pourrait être facilement écartée en numérotant les dialyseurs de manière à les employer le même nombre de fois. Malheureusement, comme l'a montré Lange, même en soumettant à l'ébullition pendant un temps rigoureusement le même, un même nombre de fois, des dialyseurs d'égale perméabilité, les modifications obtenues sont très variables d'un dialyseur à l'autre. Il est donc pour ainsi dire impossible d'opérer sur des dialyseurs identiques, ce qui revient à dire *qu'on est condamné, dans la méthode de la dialyse, à travailler sans témoins rigoureusement comparables.*

Une autre difficulté tenant aux dialyseurs est celle d'assurer l'asepsie parfaite des manipulations. Les dialyseurs ne supportent pas une stérilisation prolongée et celle-ci n'est qu'imparfaitement assurée par le procédé qui consiste à les plonger

(1) *Biochem. Zeitschr.*, 61, p. 193-255. Ce travail contient une des meilleures études qui aient été faites sur la technique de la réaction de la dialyse.

dans l'eau bouillante pendant quinze à trente secondes. Or, la présence de germes protéolytiques, même en petits nombres, peut changer le résultat d'une expérience.

#### B. — CAUSES D'ERREUR TENANT A L'EMPLOI DE TISSUS D'ORGANES.

La très grande majorité des travaux faits à l'aide de la méthode de la dialyse étant d'ordre clinique (diagnostic de la grossesse, des tumeurs, etc.) les albumines soumises à la digestion sont fournies par des fragments d'organes dont la préparation déféc-tueuse constitue une source d'erreurs sérieuse. L'organe employé doit être privé de sang qui peut lui-même être attaqué et conduire ainsi à de faux résultats. La technique d'Abderhalden, qui consiste à laver l'organe à l'eau de robinet, ne conduit pas au but; elle permet bien d'obtenir un tissu « blanc de neige », mais simplement par suite de l'hémolyse des globules rouges, les stromas restant en place. Or, comme l'a montré Lange, les stromas lavés peuvent être attaqués par le sérum et donner naissance à des produits dialysables en dehors de toute action spécifique sur l'organe. D'autre part, il est à peu près impossible de débarrasser les fragments des constituants « non spécifiques » tels les vaisseaux, les tissus de soutien, etc., et les fragments employés peuvent, à ce point de vue, présenter des différences considérables. La seule façon d'éviter ces causes d'erreur consisterait à employer, pour les recherches théoriques, des albumines purifiées, et pour le diagnostic, des suspensions de cellules correspondantes.

#### C. — CAUSES D'ERREUR TENANT AUX RÉACTIFS EMPLOYÉS.

Nous avons mentionné plus haut les difficultés que peut présenter l'interprétation de la réaction du biuret. Cette réaction peut être remplacée avantageusement, pour la recherche des albumines, par des réactions plus sensibles, celle à l'acide sulfo-salicylique, par exemple. Pour ce qui est de la recherche des produits dialysables de la digestion, la réaction du biuret, employée au début, a cédé la place à celle du tricétohydindène (ninhydrine). Cette réaction, elle aussi, peut donner lieu à de nombreuses erreurs d'interprétation.

La ninhydrine, réactif très sensible des acides  $\alpha$ -aminés et, à un moindre degré, des peptones et des albumines, réagit aussi avec d'autres substances dialysables, amines, oxéthylamines, aminoaldéhydes, dérivés uriques, etc. (1), et même avec des composés inorganiques, d'où des causes d'erreurs importantes.

D'autre part, l'intensité de la réaction, avec les peptones et les acides aminés, augmente en présence de phosphates (2). Lorsque le tissu employé, par exemple, ne contient que des traces de peptone insuffisantes par elles-mêmes pour donner la réaction de la ninhydrine, celle-ci peut devenir positive en présence de sérum, en dehors de toute digestion, par apport de phosphates. Enfin, la réaction peut devenir positive par simple addition des quantités de peptones contenues dans le sérum et le tissu et dont chacune est insuffisante à donner ce résultat pour son propre compte. L'impossibilité d'avoir des dialyseurs de perméabilité rigoureusement égale ne permet pas, dans ce cas, de recourir à des témoins : sérum inactivé + tissu, ou bien sérum et tissu placés dans des dialyseurs différents, mais plongeant dans le même liquide extérieur.

Les diverses causes d'erreur entachant la méthode de la dialyse et que nous venons de passer en revue, la rendent impropre non seulement à toute application pratique (Fränkel, Lange, Oeller et Stephan), mais même aux recherches expérimentales (3). Nous nous sommes donc proposé de reprendre cette étude à l'aide de la méthode au *B. coli* que l'un de nous a décrite il y a quelques années et qui avait permis d'aborder utilement plusieurs questions comportant la recherche d'actions protéolytiques de faible intensité (4).

(1) NEUBERG. *Biochem Zeitschr.*, **67**, p. 56.

(2) DEETJEN et FRANKEL. *Münch. med. Woch.*, **61**, p. 466.

(3) L'exemple suivant tiré du travail de Michaelis et Lagermark montre bien les irrégularités qui entachent la méthode de la dialyse. Un sérum de femme non enceinte a donné dans 3 expériences parallèles les résultats suivants :

1° Sérum seul	2° Sérum + placenta
<i>a</i> . . . . . ±	<i>a</i> . . . . . ++
<i>b</i> . . . . . +	<i>b</i> . . . . . ++
<i>c</i> . . . . . 0	<i>c</i> . . . . . 0

Suivant le hasard du groupement des dialyseurs, on aurait conclu à une réaction négative ou positive.

(4) *C. R. Soc. Biol.*, t. LXXXVII, p. 1138 et *C. R. Ac. Sc.*, t. CLXXVII, p. 1162.

### III. — Technique et sensibilité de la réaction au *B. coli*.

Au cours de recherches sur la putréfaction intestinale (1), l'un de nous fut frappé par le fait que la quantité de composés aromatiques (notamment d'indican urinaire) mesure en quelque sorte l'intensité du processus, alors que la plupart des bactéries de la putréfaction intestinale ne produisent pas ou ne produisent que très peu d'indol. Le grand producteur de l'indol intestinal étant le *B. coli*, on devait en conclure que l'activité indologène de ce bacille marchait de pair avec l'attaque des protéines dans le gros intestin. Des expériences préliminaires nous montrèrent qu'il en était bien ainsi. Il suffit d'ensemencer du *B. putrificus* (qui ne produit jamais d'indol) dans un milieu albuminoïde, du sérum, par exemple, et de faire suivre cet ensemencement par celui du *B. coli* pour voir apparaître la réaction de l'indol d'autant plus intense que l'attaque des protéines par le *B. putrificus* avait été plus longue. Reprises après la guerre, ces recherches ont été étendues à d'autres bactéries protéolytiques (2) et nous pûmes nous convaincre que la production d'indol après ensemencement de *B. coli* témoigne de l'attaque des albumines : *le B. coli*, dans les conditions de ces expériences, est un indicateur de la protéolyse.

Ensemencé dans divers milieux albuminoïdes — blanc d'œuf frais prélevé aseptiquement et dilué ; blanc d'œuf étendu au cinquième et stérilisé ; caséinate ou albuminate de soude ; sérum sanguin prélevé dans de bonnes conditions — le *B. coli* y cultive plus ou moins bien, mais sans produire d'indol. Celui-ci apparaît si le milieu a subi auparavant une action protéolytique quelconque, à cette seule condition que l'albumine employée contienne du tryptophane : *on se trouve en présence d'une réaction bactériologique simple de la protéolyse*.

Dans nos premières expériences nous nous étions servis, pour rechercher l'indol, de la réaction de Salkowski (nitrite de potasse et acide sulfurique). Par la suite nous n'avons plus

(1) E. METCHNIKOFF et E. WOLLMAN, Sur quelques essais de désintoxication intestinale. *C. R. Acad. des Sc.*, **154**, p. 1573 et Ces *Annales*, **25**, p. 825.

(2) E. WOLLMAN, *B. coli* comme indicateur de la protéolyse. *C. R. Soc. Biol.*, **82**, p. 1263.

employé que la réaction d'Ehrlich au p-diméthylamidobenzaldéhyde, beaucoup plus sensible. On décèle couramment, par cette méthode, l'indol à une dilution de 1 p. 4.000.000 à 1 p. 8.000.000 et les bons échantillons de p-diméthylamido-benzaldéhyde donnent une réaction nette avec des dilutions d'indol à 1 p. 10.000.000.

Voici la technique suivie.

Le milieu dans lequel on veut rechercher l'indol estensemencé de *B. coli* et placé à l'étuve à 37° pendant trente-six à quarante-huit heures. On en prélève une partie qu'on mélange en agitant légèrement avec un volume égal d'éther; on décante celui-ci et on y ajoute le quart environ de son volume d'une solution à 4 p. 100 de p-diméthylamidobenzaldéhyde; on fait arriver doucement, au fond du tube contenant ce mélange, 1 à 2 cent. cubes d'acide chlorhydrique à l'aide d'une pipette effilée : en présence d'indol, il se forme, à la limite des couches d'éther et d'acide, un anneau d'un beau rouge violet (1).

Avant d'appliquer cette réaction à l'étude d'une protéolyse donnée on doit s'assurer que l'albumine envisagée contient du tryptophane et est susceptible, par conséquent, de donner naissance à de l'indol sous l'action du *B. coli*. Pour cela, on soumet cette albumine à la digestion trypsique, à l'hydrolyse acide ou, encore, à l'attaque par une bactérie protéolytique : nous employons souvent, simultanément, les trois procédés. Dans le milieu ainsi digéré (et neutralisé si l'on a eu recours à l'hydrolyse acide), on ensemence un *B. coli* très indologène et on pratique, comme il a été dit ci-dessus, la réaction de l'indol (2).

Ayant reconnu, de cette façon, la présence de tryptophane dans l'albumine étudiée, on procède à l'expérience proprement dite : on met cette albumine en contact avec le milieu dont on désire déceler l'action protéolytique. Au bout de quelques jours on y ensemence du *B. coli* et on fait la réaction de l'indol. Un tube contenant l'albumine seule dans l'eau physiologique, ou mieux,

(1) Suivant la technique mise au point par A. Berthelot. Recherches sur quelques caractères du *Proteus vulgaris*, Thèse, Paris, 1913.

(2) Etant donné l'extrême sensibilité de la réaction d'Ehrlich, la recherche de l'indol dans un milieu donné, après digestion et ensemencement de *B. coli*, fournit un moyen simple pour y caractériser le tryptophane.

dans une solution nutritive (1), et un autre contenant le milieu dont on veut étudier le pouvoir protéolytique, servent de témoins.

Avant d'aborder par ce procédé l'étude de la protéolyse sérique, il était nécessaire de comparer la sensibilité de notre technique à celle de la méthode de la dialyse (2).

Une première série d'expériences a été faite dans le but de savoir à quel moment chacune des deux méthodes permet de déceler une protéolyse commençante.

**EXPÉRIENCE I.** — Du blanc d'œuf dilué au cinquième et stérilisé estensemencé avec du *B. subtilis*. A différents intervalles les tubes sont soumis à une ébullition prolongée, après quoi une partie du contenu (5 cent. cubes) est portée dans un dialyseur d'Abderhalden (n° 579 A) placé lui-même dans un petit récipient renfermant 20 cent. cubes d'eau distillée. L'autre partie estensemencée de *B. coli*. Quarante-huit heures plus tard la réaction de la ninhydrine est pratiquée sur le dialysat de la première partie et celle de l'indol, d'après la technique décrite plus haut, sur la seconde. Voici les résultats obtenus :

TUBE		RÉACTION de la ninhydrine	RÉACTION de l'indol
1.	Culture de <i>B. subtilis</i> de 15 heures . . . . .	—	±
2.	— de 24 — . . . . .	0	+
3.	— de 39 — . . . . .	±	+
4.	— de 48 — . . . . .	±	++
5.	— de 63 — . . . . .	+	++
6.	— de 71 — . . . . .	++	+++

Il est à remarquer que, dans cette expérience, la dilution à la suite de la dialyse n'a été que de 1 p. 5 environ, c'est-à-dire trois fois moins forte que dans la technique habituelle d'Abderhalden. D'autre part la dialyse a été prolongée pendant quarante-huit heures au lieu des seize heures prescrites dans le procédé habituel. Les résultats notés sont donc, pour la méthode de la dialyse, des résultats trop forts. Malgré cela, les indications fournies par la réaction au *B. coli* ont été nettement plus précoces et plus marquées.

(1) Nous employons la solution suivante :

Phosphate monopotassique . . . . .	2 gr.
Lactate d'ammonium . . . . .	6 gr.
Chlorure de sodium . . . . .	5 gr.
Eau distillée . . . . .	1.000 gr.

Alcaliniser avec de la soude déci-normale.

(2) E. WOLLMAN et M<sup>me</sup> WOLLMAN. *Bull. Soc. Chimie biol.*, 5, p. 253.

EXPÉRIENCE II. — A une série de tubes contenant du blanc d'œuf stérilisé, au cinquième, on ajoute XII gouttes d'une solution très étendue de trypsine. On arrête la digestion en faisant bouillir les tubes à intervalles de quelques minutes et l'on procède ensuite comme dans l'expérience précédente. Les tubes n°s 3, 4, 5 sont faits en double, de manière à vérifier la régularité des résultats. Le tableau suivant résume ceux-ci :

TUBE		RÉACTION de la ninhydrine	RÉACTION de l'indol
1.	Témoin . . . . .	—	—
2.	Après 5 minutes de digestion. . . . .	0	0
3.	{ — 10 — . . . . .	(±)	(++)
3'.	{ — 12 — . . . . .	(+)	(++)
5.	{ — 20 — . . . . .	(++)	(++++)
5'.	{ — 25 — . . . . .	++	+++

Les remarques faites à propos de l'expérience précédente s'appliquent également à celle-ci.

EXPÉRIENCE III. — Comme ci-dessus, les tubes recevant III gouttes d'une solution de trypsine à 3 p. 100. Les tubes 2, 3, 4 sont faits en double.

TUBE		RÉACTION de la ninhydrine	RÉACTION de l'indol
1.	Témoin . . . . .	0	0
2.	{ Après 5 minutes de digestion. . . . .	(±)	(N'est pas faite.)
2'.	{ — 10 — . . . . .	(+)	(++)
3'.	{ — 15 — . . . . .	(+) 0	(++)
5.	— 20 — . . . . .	+	++
6.	— 25 — . . . . .	+	+
7.	— 30 — . . . . .	+	++

Les tubes 3 et 4, faits en double, donnent, par la méthode de la dialyse, tantôt une réaction négative, tantôt une positive.

EXPÉRIENCE IV. — Nous nous sommes proposé, dans cette expérience, de comparer la sensibilité des deux méthodes en cherchant à déceler des quantités connues d'une peptone donnée, mélangée à un milieu albuminoïde. A cet effet, on ajoute à une solution de blanc d'œuf, au cinquième, des quantités croissantes de peptone pancréatique de fibrine donnant une réaction nette avec la ninhydrine à 1 p. 3.000 et la réaction de l'indol à 1 p. 5.000 après ensemencement avec du *B. coli* (voir plus loin). Comme dans les expériences précédentes, une partie du contenu (5 cent. cubes) de chaque tube est portée dans un dialyseur, l'autre étant ensemencée avec du *B. coli*. Les tubes 2, 3, 4 et 5 sont faits en double.

Voici les résultats obtenus :

TUBE		RÉACTION de la ninhydrine	RÉACTION de l'indol
1.	Témoin (sans peptone). . . . .	±	0
2.	{ Peptone à 1 p. 3.200 . . . . .	(±)	+
2'.}		(±)	+
3.	— 1 p. 1.600 . . . . .	(±)	(++)
3'.}		(±)	(++)
4.	— 1 p. 800. . . . .	(+)	(+++)
4'.}		(+)	(+++)
5.	— 1 p. 400. . . . .	(++++)	(++++)
5'.}		(+++)	(+++)
6.	— 1 p. 200. . . . .	++++	++++

On remarquera que le tube témoin, sans peptone, a donné une réaction ± avec la ninhydrine.

L'ensemble de ces résultats montre que la réaction au *B. coli* est d'une grande régularité et d'une sensibilité supérieure à celle de la dialyse.

Enfin, nous avons recherché, pour plusieurs échantillons de peptone, quelle était la sensibilité limite de la réaction de la ninhydrine et de celle de l'indol. Contrairement à ce que l'on pouvait penser *a priori* (la sensibilité de la réaction au *B. coli* étant liée à la teneur d'une peptone en tryptophane), les dilutions limites ont varié d'une façon sensiblement parallèle pour les échantillons de peptone examinés avec les deux méthodes (*peptone pancréatique de fibrine, pepsique de fibrine, pepsique de l'œuf, Bacta-peptone et peptone Chapoteau*) (1).

La ninhydrine employée directement, c'est-à-dire sans dialyse préalable, réagissait avec ces peptones à des dilutions allant de 1 p. 500 à 1 p. 3.000. Avec le *B. coli*, on obtenait une réaction de l'indol positive, suivant les peptones, de 1 p. 500 à 1 p. 5.000. Or, dans la pratique, la ninhydrine n'intervient qu'après dialyse et, par conséquent, dilution correspondante. Dans la technique habituelle 1 c. c. 5 de sérum sont dialysés contre 20 cent. cubes d'eau, ce qui correspondrait à une dilution de 1 p. 14 en admettant une répartition tout à fait homogène. Avec les échantillons de peptone employés la technique d'Abderhalden ne permettrait donc de déceler que

(1) Seule une peptone de caséine, due à l'obligeance de M. Berthelot, a fait exception. La réaction de l'indol était encore positive avec cette peptone, à 1 pour 6.000 alors que celle à la ninhydrine devenait négative à 1 p. 1.000.

1 p. 35 à 1 p. 250 environ de peptone, alors que la réaction au *B. coli* donnerait encore des résultats positifs à 1 p. 250 — 1 p. 2.500, si l'on diluait les solutions de moitié comme nous le faisons pour les sérum.

La méthode au *B. coli* permet, par conséquent, non seulement d'exclure les diverses causes d'erreur inhérentes à l'emploi des dialyseurs; elle présente, en outre, sur celle de la dialyse, l'avantage de suivre de plus près les phénomènes de protéolyse.

#### IV. — Protéolyse sérique chez le lapin normal ou préparé.

Plusieurs séries d'expériences ont été faites en vue de déterminer les modifications des propriétés protéolytiques du sang à la suite d'introduction parentérale d'albumines. Y a-t-il augmentation du pouvoir protéolytique dans ces conditions? La protéolyse constatée est-elle spécifique? L'expérimentation semblait présenter, pour répondre à ces questions préliminaires, des avantages marqués sur les recherches cliniques: simplicité d'interprétation des résultats, possibilité d'employer des solutions d'albumine au lieu de tissus d'organes dont on a vu plus haut les inconvénients.

Dans une première série d'expériences cinq lapins ont reçu trois injections intrapéritonéales d'une solution de blanc d'œuf au cinquième stérilisée à 115°. Deux de ces lapins meurent en cours d'expérience. Voici les résultats fournis par les trois autres.

*Lapin 19/20.* — Saigné à l'oreille le 30 juin, à 10 heures du matin, après avoir été mis à jeun pendant quarante-huit heures; sang centrifugé et sérum décanté le jour même. On le répartit en deux tubes et on fait l'expérience préliminaire suivante :

Tube 1 : Sérum + 1/20 de son volume de solution de blanc d'œuf.

Tube 2 : (témoin) sérum seul.

Les deux tubes sont portés à l'étuve à 37° jusqu'au 8 juillet. On en dilue le contenu avec de la solution nutritive (voir plus haut) et l'onensemence du *B. coli*. On recherche la réaction de l'indol le 10 juillet: *la réaction est négative pour les deux tubes.*

Le lapin reçoit trois injections intrapéritonéales de 2 cent. cubes de solution de blanc d'œuf chaque fois, le 30 juin, les 3, 6 et 7 juillet. On le saigne le 18 juillet (après un jeûne de quarante-huit heures). Le sérum est réparti en trois tubes.

Tube 1 : Sérum + 1/20 de son volume de solution de blanc d'œuf.

Tube 2 : Sérum seul (témoin).

Tube 3 : Sérum dilué de solution nutritive (témoin) + *B. coli*.

Le 21 juillet la réaction de l'indol se montre négative pour le tube 3.

Le 28 juillet on dilue de solution nutritive le contenu des tubes 1 et 2 et on y ensemence du *B. coli*.

Le 30 juillet la réaction de l'indol est négative pour les deux tubes. Le sérum de ce lapin dilué à 1 p. 10 précipite le blanc d'œuf à 1 p. 1.000.

*Lapin 18/49.* — Comme ci-dessus. Expérience préliminaire (sérum normal) ; réaction négative pour les deux tubes (sérum seul et sérum + blanc d'œuf).

Expérience définitive (après préparation par le blanc d'œuf) : réaction de l'indol négative avec le sérum seul ainsi qu'avec le sérum + blanc d'œuf.

*Lapin 23.* — Comme ci-dessus, avec cette différence que le lapin ne reçoit que 1 cent. cube de solution de blanc d'œuf à chaque injection.

Expérience préliminaire (sérum normal) : la réaction est négative avec le sérum seul ainsi qu'avec le sérum + blanc d'œuf.

Expérience définitive (après préparation par le blanc d'œuf) : réaction de l'indol négative aussi bien avec le sérum seul qu'avec le sérum + blanc d'œuf.

Dans ces trois expériences, le sérum s'est montré dépourvu de toute action protéolytique aussi bien après qu'avant la préparation des animaux.

Les lapins employés étant atteints de pasteurellose (quatre d'entre eux succombent successivement le 7 juillet, le 15 juillet, le 9 août et le 10 août), l'expérience a été recommandée sur un autre groupe d'animaux.

*Lapin 64.* — Mis à jeun le 1<sup>er</sup> août, saigné à l'oreille le 2 août. Le sang est centrifugé et le sérum réparti le lendemain dans 3 tubes.

Tube 1 : sérum + 1/20<sup>e</sup> de son volume de solution de blanc d'œuf.

Tube 2 : sérum seul (témoin).

Tube 3 : sérum dilué de solution nutritive + *B. coli*.

Le tube 3 donne une réaction de l'indol négative.

19 août. Le contenu des tubes 1 et 2 est dilué et ensemencé de *B. coli*.

24 août :

Tube 1 : réaction de l'indol . . . . . + +

Tube 2 : réaction de l'indol . . . . . -

Le lapin reçoit des injections de solution de blanc d'œuf (3 cent. cubes chaque fois) les 9, 18, 25 août et 1<sup>er</sup> septembre; il est mis à jeun le 18 septembre et saigné le lendemain.

20 septembre. Le sérum est réparti dans cinq tubes.

Tube 1 et 1' : sérum + 1/20<sup>e</sup> de solution de blanc d'œuf.

Tube 2 et 2' : sérum seul (témoins).

Le cinquième tube reçoit du sérum dilué de solution nutritive et est ensemencé aussitôt de *B. coli*.

La réaction de l'indol est négative pour ce dernier tube.

28 septembre. Le contenu des tubes 1 et 2 est dilué et ces tubes ensemencés de *B. coli*.

Tube 1 (sérum + blanc d'œuf) : réaction de l'indol . . . . . +

Tube 2 (sérum seul) : réaction de l'indol . . . . . -

3 octobre. Le contenu des tubes 1' et 2' est dilué et les tubes ensemencés de *B. coli*.

Tube 1' : réaction de l'indol . . . . . + +

Tube 2' : réaction de l'indol . . . . . +

*Lapin 65.* — Comme ci-dessus.



préparés par des injections intrapéritonéales de blanc d'œuf cru.

**EXPÉRIENCE.** — Les lapins 76 et 79 reçoivent les 19, 24 et 29 janvier respectivement 5, 3 et 2 cent. cubes de blanc d'œuf cru en injection intrapéritonéale ; saignés le 3 février, leur sérum ni seul, ni mélangé pendant trois jours au blanc d'œuf cru n'a donné de réaction de l'indol, aprèsensemencement de *B. coli*.

Deux nouvelles injections de blanc d'œuf (par voie sous-cutanée) sont faites le 6 et le 9 février. Les lapins sont saignés le 12 février. Les sérums mis à l'étuve pendant dix jours ont donné une réaction de l'indol négative aprèsensemencement par le *B. coli*.

*Cette expérience montre que le sérum des lapins préparés par des injections de blanc d'œuf cru n'a acquis aucun pouvoir protéolytique pour cette substance.*

Dans deux autres expériences, les deux méthodes, celle de la dialyse et celle au *B. coli*, sont employées parallèlement, en partie tout au moins.

Dans la première de ces expériences, trois lapins reçoivent le 26 février en injections intraveineuses :

*Lapin 78 : 5 cent. cubes d'une solution de blanc d'œuf.*

*Lapin 83 : 3 cent. cubes de blanc d'œuf cru dilué de moitié.*

*Lapin 84 : 3 cent. cubes de sérum de cheval.*

Les quatre lapins sont saignés le 29 mars, le sang centrifugé et le sérum décanté le même jour. Les sérums sont répartis en tubes soit seuls, soit mélangés aux albumines employées.

Le 3 avril, une partie (1 c. c. 5) du contenu de chaque tube est prélevée et portée dans des dialyseurs d'Abderhalden ; une autre partie est diluée etensemencée de *B. coli*. Le 5 avril, on recherche l'indol dans cette seconde partie et on fait la réaction de la ninhydrine sur la première.

Voici les résultats des deux réactions.

	RÉACTION de l'indol	RÉACTION de la ninhydrine
<i>Lapin 78 (préparé avec du blanc d'œuf stérilisé).</i>	—	—
Tube 1 (sérum + blanc d'œuf stérilisé). . . . .	0	0
Tube 2 (sérum + sérum de cheval). . . . .	0	0
Tub 3 (sérum seul; témoin) . . . . .	0	N'a pas été faite.
<i>Lapin 83 (préparé avec du blanc d'œuf frais).</i>		
Tube 1 (sérum + blanc d'œuf) . . . . .	0	++
Tube 2 (sérum seul) . . . . .	0	0
<i>Lapin 84 (préparé avec du sérum de cheval).</i>		
Tube 1 (sérum + sérum de cheval) . . . . .	+	
Tube 2 (sérum + blanc d'œuf stérilisé) . . . . .	±	(La réaction n'a pas été faite.)
Tube 3 (sérum seul) . . . . .	0	

Le sérum de cheval et le blanc d'œuf donnent, isolément, une réaction d'indol négative.

Dans la deuxième série, trois lapins sont saignés à l'oreille le 31 octobre. Le sérum prélevé est divisé en deux parties.

2 novembre, la première est répartie dans trois tubes pour chaque lapin et mise à l'étuve.

Tube 1 : sérum seul.

Tube 2 : sérum + solution de blanc d'œuf.

Tube 3 : sérum + sérum de cheval.

La deuxième partie du sérum est distribuée dans des dialyseurs d'Abderhalden.

Dialyseur 1 : sérum seul.

Dialyseur 2 : sérum + 10 gouttes de solution de blanc d'œuf.

Dialyseur 3 : sérum + sérum de cheval.

La réaction de l'indol est faite sur la première partie après trois jours d'étuve et deux jours de culture de *B. coli*. Celle de la ninhydrine est faite sur la seconde après vingt et une heures de dialyse. Voici les résultats obtenus :

	RÉACTION de l'indol	RÉACTION de la ninhydrine
<i>Lapin 51 :</i>	—	—
Sérum seul . . . . .	±	0
Sérum + blanc d'œuf . . . . .	+	0
Sérum + sérum de cheval . . . . .	+++	+
Sérum de cheval seul . . . . .	+	0
<i>Lapin 52 :</i>		
Sérum seul . . . . .	+	0
Sérum + blanc d'œuf . . . . .	+	+
Sérum + sérum de cheval . . . . .	+	0
Blanc d'œuf seul . . . . .	0	0
<i>Lapin 53 :</i>		
Sérum seul . . . . .	0	0
Sérum + blanc d'œuf . . . . .	+	0

Les lapins reçoivent le 31 octobre une injection intraperitoneale :

*Lapin 51* : de 10 cent. cubes de solution de blanc d'œuf.

*Lapin 52* : de 6 cent. cubes de blanc d'œuf cru au tiers.

*Lapin 53* : de 10 cent. cubes de sérum de cheval.

Saignés le 6 novembre, le sérum de chaque lapin est réparti le 8 novembre dans 4 tubes.

Tube 1 : sérum seul.

Tube 2 : sérum + blanc d'œuf cru.

Tube 3 : sérum + solution stérile de blanc d'œuf.

Tube 4 : sérum + sérum de cheval.

12 novembre. Une partie du contenu de chaque tube (4 c. c. 5) est portée dans un dialyseur d'Abderhalden, l'autre est diluée et ensemencée de *B. coli*.

14 novembre. La réaction de la ninhydrine est pratiquée sur la première partie, celle de l'indol sur la seconde. Voici les résultats de ces réactions.

	RÉACTION de la ninhydrine	RÉACTION de l'indol
<i>Lapin 51</i> (préparé avec une solution stérilisée de blanc d'œuf) :	—	—
Tube 1 : (sérum seul) . . . . .	±	±
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf cru . . .	±	±
Tube 3 : sérum + solution stérilisée de blanc d'œuf . . . . .	±	+
Tube 4 : sérum de cheval. . . . .	0	±
<i>Lapin 52</i> (préparé avec du blanc d'œuf cru)		
Tube 1 . . . . .	±	+
Tube 2 . . . . .	+	+
Tube 3 . . . . .	0	±
Tube 4 . . . . .	+	±
<i>Lapin 53</i> (préparé avec du sérum de cheval) :		
Tube 1 . . . . .	+	+
Tube 2 . . . . .	+	+
Tube 3 . . . . .	++	±
Tube 4 . . . . .	0	+

Ni la réaction de la ninhydrine, ni celle de l'indol ne montrent aucune augmentation du pouvoir protéolytique du sérum à la suite du traitement par les albumines.

Dans une autre expérience, les lapins 78, 83, 94 (voir plus haut) ainsi qu'un lapin nouveau 85 reçoivent en injection intraperitoneale :

*Lapin 78* : 5 cent. cubes d'une solution stérilisée de blanc d'œuf.

*Lapin 83* : 3 cent. cubes de blanc d'œuf cru dilué.

*Lapin 84* : 3 cent. cubes de sérum de cheval.

*Lapin 85* : 3 cent. cubes d'une solution de blanc d'œuf stérilisée.

Le lapin 82 sert de témoin.

Les lapins sont saignés trois ou quatre jours après l'injection d'albumine, le sérum réparti en tubes soit seul, soit mélangé aux albumines employées est mis à l'étuve. Au bout de sept jours, il est dilué etensemencé avec du *B. coli*. Voici les résultats de la réaction de l'indol.

	RÉACTION de l'indol
<i>Lapin 78</i> (préparé avec solution de blanc d'œuf stérilisée) :	—
Tube 1 : sérum seul . . . . .	±
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf stérile. . . . .	0
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	±
<i>Lapin 83</i> (préparé avec du blanc d'œuf frais) :	
Tube 1 : sérum seul . . . . .	±
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf frais. . . . .	0
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	±
<i>Lapin 84</i> (préparé avec du sérum de cheval) :	
Tube 1 : sérum seul . . . . .	0
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf stérile. . . . .	0
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	0

RÉACTION  
de l'indol

**Lapin 85** (préparé avec solution de blanc d'œuf stérilisée) :

Tube 1 : sérum seul . . . . .	+
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf . . . . .	++
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	+++

Le sérum de ce lapin prélevé avant l'injection de blanc d'œuf avait donné les résultats suivants :

Tube 1 : sérum seul . . . . .	±
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf . . . . .	±
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	±

Enfin le sérum du lapin 82, témoin, a donné :

Tube 1 : sérum seul . . . . .	+
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf . . . . .	±
Tube 3 : sérum + sérum de cheval. . . . .	+

Nous avons également préparé deux lapins par des injections de caséine. Étant donné la teneur élevée de cette protéine en tryptophane, la digestion par le sérum devait être constatée avec une facilité particulière (1). Dans les deux cas, pourtant, le sérum des animaux préparés s'est montré dépourvu de toute action sur la caséine.

Dans une dernière expérience, nous avons cherché à vérifier les résultats de Heilner et Petri qui avaient constaté une augmentation du pouvoir protéolytique du sérum à la suite d'épanchement sanguin sous-cutané.

Un lapin est saigné à l'oreille et le sérum obtenu est réparti dans 3 tubes.

Tube 1 : sérum seul.	
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf.	
Tube 3 : sérum + sérum de cheval.	

Après sept jours d'étuve, le contenu des tubes est dilué etensemencé de *B. coli*. Voici les résultats de la réaction de l'indol.

RÉACTION  
de l'indol

Tube 1 . . . . .	±
Tube 2 . . . . .	±
Tube 3 . . . . .	+
Sérum de cheval seul . . . . .	++
Blanc d'œuf seul . . . . .	0

On incise la veine jugulaire du lapin et on referme la peau avec des agrafes

(1) Nous rappelons que nous avons pu déceler par la réaction au *B. coli* des quantités de peptone de caséine inférieures à 1 p. 5.000, alors que la réaction à la ninhydrine devenait à peine perceptible à 1 p. 1.000 de cette peptone.

de Michel. Le sérum prélevé quatre jours après cette intervention et traité comme ci-dessus donne les résultats suivants :

	RÉACTION de l'indol
Tube 1 : sérum seul . . . . .	—
Tube 2 : sérum + blanc d'œuf . . . . .	+
Tube 3 : sérum + sérum de cheval . . . . .	++
Blanc d'œuf seul . . . . .	0
Sérum de cheval seul . . . . .	+

Il y a donc eu, dans ce cas, une légère augmentation du pouvoir protéolytique pour le sérum de cheval et, peut-être, pour le blanc d'œuf.

L'ensemble de ces expériences montre qu'on ne note que rarement une augmentation marquée du pouvoir protéolytique du sérum chez les animaux préparés par des injections d'albumines. Une telle augmentation lorsqu'elle existe, n'est pas spécifique, le sérum de cheval donnant, dans nos expériences, des résultats plus marqués que le blanc d'œuf, quelle qu'ait été l'albumine employée dans la préparation de l'animal. D'autre part, le sérum normal peut, en présence d'albumine étrangère, ou même seul, présenter de la protéolyse après un séjour prolongé à l'étuve.

Pour en finir avec les expériences sur l'introduction parentérale d'albumines chez l'animal, nous dirons quelques mots des résultats obtenus avec des animaux infectés ou préparés par des injections de *suspensions bactériennes*.

Nous avons vu plus haut que, d'après Abderhalden, le sérum de l'organisme tuberculeux acquiert le pouvoir de digérer les protéines du bacille de Koch. La réaction serait d'une spécificité extraordinaire, le sérum de bovidés tuberculeux, par exemple, n'attaquant que les bacilles du type bovin.

Après avoir vérifié que les corps des bacilles tuberculeux cultivés en bouillon glycériné renferment du tryptophane, nous avons fait agir sur de tels bacilles dégraissés (1) du sérum normal de lapin, ainsi que des sérum de lapins tuberculeux ou bien préparés par des injections de bacilles dégraissés et qui donnaient en présence d'antigène tuberculeux

(1) Des bacilles tuberculeux dégraissés avaient été mis obligamment à notre disposition par M. Goris et par MM. Nègre et Boquet, que nous tenons à remercier ici.

une réaction de fixation fortement positive. *Pas plus que le sérum normal, le sérum d'animaux tuberculeux ou préparés par des injections de bacilles dégraissés n'a jamais montré d'action protéolytique vis-à-vis des corps bacillaires.*

Il en a été de même dans quelques expériences où les lapins avaient été préparés par des injections de bacilles typhiques ou de *B. coli* tués par la chaleur.

**PROTÉOLYSE SÉRIQUE CHEZ LA FEMME EN ÉTAT DE GESTATION  
AINSI QUE CHEZ LA FEMME ET L'HOMME NORMAUX.**

Malgré les résultats peu encourageants fournis par les expériences sur les animaux que nous venons d'exposer, nous avions voulu étudier, à l'aide de la méthode au *B. coli*, les modifications du pouvoir protéolytique du sérum dans la grossesse.

Nous avons vu, en effet, que c'étaient les constatations faites dans la grossesse qui furent le point de départ de la théorie des « ferments de défense ». Dans les dernières éditions de son livre, Abderhalden maintient l'exactitude des faits avancés et la valeur de sa réaction en s'appuyant sur plusieurs milliers d'examens ne comportant qu'une ou deux erreurs de diagnostic. Les résultats discordants obtenus par certains chercheurs s'expliqueraient par les difficultés de la méthode.

Il semblait impossible, devant le résultat de nos expériences sur les animaux, d'admettre, avec Abderhalden, une production de ferments spécifiques pour le placenta. Mais on pouvait se demander si les particularités du métabolisme dans la grossesse ne déterminaient pas une augmentation non spécifique du pouvoir protéolytique du sérum, utilisable dans la pratique, et qu'une technique simple permettrait de mettre en évidence avec régularité (1).

Nos examens ont porté sur douze sérum de femmes

(1) En compulsant les publications récentes sur le diagnostic de la grossesse, nous venons de retrouver un travail de Rivas et Buckley (*Journ. of med. Research*, 14, p. 297), dans lequel l'idée d'appliquer le *B. coli* au diagnostic de la grossesse a également été exprimée. Trois sérum ont été examinés par cette technique : un sérum gravide, un sérum de femme vierge et un sérum d'homme. Tous les trois ont donné un résultat négatif, ce qui ne saurait surprendre, les auteurs n'ayant employé pour la recherche de l'indol que la réaction au nitrite de potasse et à l'acide sulfurique.

enceintes, neuf sérums de femmes normales et cinq sérums d'hommes. Dans tous les cas, le sang a été prélevé à jeun le matin. Le placenta a été préparé en suivant scrupuleusement la technique indiquée par Abderhalden. Voici le résumé de ces expériences :

a) **Sérums de femmes enceintes.**

*Sérum 1.* — Sang prélevé le 12 juin 1922; centrifugé; le sérum est décanté aussitôt; une partie est diluée avec de l'eau physiologique et ensemencée avec du *B. coli*, le reste mis à la glacière jusqu'au 21 juin.

La réaction de l'indol pratiquée sur la première partie au bout de vingt-quatre et quarante-huit heures est négative.

21 juin. Le sérum est distribué dans 2 tubes.

Tube 1 : sérum seul (témoin).

Tube 2 : sérum + placenta.

Mis à l'étuve à 37° jusqu'au 4 juillet.

4 juillet. Le contenu des 2 tubes est dilué et ensemencé avec du *B. coli*.

7 juillet. On recherche l'indol dans les deux tubes.

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	}
Tube 2 . . . . .	++	

Réaction positive.

*Sérum 2.* — Comme ci-dessus.

Sérum seul (témoin) . . . . .	0	}
Sérum + placenta . . . . .	+	

Réaction positive.

*Sérum 3.* — Comme ci-dessus.

Sérum seul (témoin) . . . . .	±	}
Sérum + placenta . . . . .	++	

Réaction positive.

*Sérum 4.* — Sérum prélevé le 21 juin. Distribué dans 2 tubes.

Tube 1 : sérum seul (témoin).

Tube 2 : sérum + placenta.

27 juin. Une partie du contenu de chaque tube est diluée et ensemencée avec du *B. coli*.

29 juin :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	}
Tube 2 . . . . .	±	

Réaction douteuse.

4 juillet. La partie restant dans chaque tube est diluée et ensemencée avec du *B. coli*.

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	}
Tube 2 . . . . .	++	

Réaction positive.

*Sérum 5.* — Comme ci-dessus.

29 juin. 1<sup>er</sup> essai :

Tube 1 (témoin) . . . . .	N'a pas été fait.
---------------------------	-------------------

Tube 2 . . . . .	++
------------------	----

1<sup>er</sup> juillet. 2<sup>e</sup> essai :

Tube 1 (témoin) . . . . .	±
---------------------------	---

Tube 2 . . . . .	++	}
------------------	----	---

Réaction positive.

Sérum 6. — Sérum prélevé le 24 juin.

7 juillet :

Tube 1 (témoin) . . . . .	$\pm$	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	$\pm$	

Sérum 7. — Comme ci-dessus.

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	+	

Sérum 8. — Comme ci-dessus.

Tube 1 (témoin) . . . . .	$\pm$	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	++	

Sérum 9. — Prélevé le 29 juin.

14 juillet :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	+	

Sérum 10. — Prélevé le 30 juin.

14 juillet :

Tube 1 (témoin) . . . . .	$\pm$	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	$\pm$	

Sérum 11. — Comme ci-dessus.

Tube 1 (témoin) . . . . .	$\pm$	Réaction faiblement positive.
Tube 2 . . . . .	+	

Sérum 12. — Comme ci-dessus.

Tube 1 (témoin) . . . . .	++	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	++	

### b) Sérum de femmes non enceintes.

Sérum 1. — Prélevé le 22 juin; réparti dans 2 tubes.

Tube 1 : (témoin) sérum seul.

Tube 2 : sérum + placenta.

26 juin. Le contenu des 2 tubes est dilué etensemencé avec du *B. coli*.

7 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	++	

Sérum 2. — Prélevé le 24 juin.

Tube 1 : (témoin) sérum seul.

Tube 2 : sérum + placenta.

4 juillet. Le contenu des deux tubes est dilué etensemencé de *B. coli*.

7 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	0	

Sérum 3. — Prélevé le 3 juillet.

14 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	+	

Sérum 4. — Comme ci-dessus.

Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	++	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	++	

*Sérum 5.* — Comme ci-dessus.

Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	±	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	±	

*Sérum 6.* — Comme ci-dessus.

Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	++	

*Sérum 7.* — Prélevé le 5 juillet; réparti aussitôt dans 2 tubes.

Tube 1 : (témoin) sérum seul.

Tube 2 : sérum + placenta.

Le contenu des 2 tubes est dilué le 12 juillet et ensemencé de *B. coli*.

14 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	++	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	++	

*Sérum 8.* — Comme ci-dessus.

14 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	+	

*Sérum 9.* — Prélevé le 15 juillet.

1<sup>er</sup> août. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	±	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	±	

*Sérum 9 bis.* — 4 août. Même femme, sérum prélevé pendant les règles.

23 août, réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+++	Réaction négative.
Tube 2 . . . . .	++	

### c) Sérums d'homme.

*Sérum 1.* — Prélevé le 14 juin; décanté le jour même et conservé à la glacière jusqu'au 21 juin, réparti dans 2 tubes dont le contenu est dilué et ensemencé de *B. coli*, le 27 juin.

27 juin. Réaction de l'indol :

Tube 1 : (témoin) sérum seul . . .	0	Réaction négative.
Tube 2 : sérum + placenta . . .	0	

*Sérum 2.* — Comme ci-dessus.

29 juin. Premier essai :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	Réaction douteuse.
Tube 2 . . . . .	±	

1<sup>er</sup> juillet. Deuxième essai :

Tube 1 (témoin) . . . . .	±	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	++	

*Sérum 3.* — Comme ci-dessus.

7 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	Réaction positive.
Tube 2 . . . . .	++	

*Sérum 4.* — Prélevé le 21 juin et réparti le jour même.

Tube 1 : (témoin) sérum seul.

Tube 2 : sérum + placenta.

7 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0	}
Tube 2 . . . . .	++	

Réaction positive.

*Sérum 5.* — Comme ci-dessus.

7 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+++	}
Tube 2 . . . . .	++	

Réaction négative.

*Sérum 6.* — Prélevé le 30 juin; décanté le jour même et réparti dans 2 tubes; le 12 juillet le contenu est dilué et ensemencé de *B. coli*.

14 juillet. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	++	}
Tube 2 . . . . .	++	

Réaction négative.

Pour résumer, nous voyons qu'avec le sang humain, la réaction a été :

a) positive 8 fois, négative 3 fois, douteuse 1 fois,

    avec le sérum de femmes enceintes.

b) positive 2 fois, négative 7 fois,

    avec le sérum de femmes non enceintes.

c) positive 3 fois, négative 2 fois, douteuse 1 fois,

    avec le sérum d'homme.

*Il semblerait donc qu'il y ait une augmentation réelle du pouvoir protéolytique du sang dans la grossesse.* Le sérum d'homme possède normalement une action protéolytique marquée dans la moitié des cas environ.

#### GROSSESSE CHEZ LES ANIMAUX.

Nous avons étudié, au point de vue de leur action protéolytique, six sérums de mouton. Pour des raisons techniques et à titre d'orientation, l'examen n'a porté que sur des brebis pleines (4) et des bêliers (2) (1). D'autre part un certain nombre d'auteurs ayant affirmé que l'action des ferments est organo-spécifique, c'est-à-dire dirigée non pas contre les albumines d'une espèce mais contre celles d'un organe déterminé, quelle qu'en soit l'origine, nous avons fait agir ces sérums sur un placenta de brebis et sur un placenta humain.

Voici le résumé de ces expériences.

(1) Nous remercions M. Cauchemez de nous avoir facilité le prélèvement de sang et de placentas de mouton.

*Sérum 1.* — Brebis pleine; sang prélevé le 29 septembre et réparti dans 3 tubes.

- Tube 1 : sérum seul.
- Tube 2 : sérum + placenta humain.
- Tube 3 : sérum + placenta de mouton.

Le sérum dilué aussitôt après la prise et ensemencé avec du *B. coli* donne une réaction de l'indol très faible ( $\pm$ ).

5 octobre. Le contenu des tubes est dilué et ensemencé avec du *B. coli*.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	++
Tube 2 . . . . .	++
Tube 3 . . . . .	++

*Sérum 2.* — Brebis pleine, sang prélevé le 26 septembre; ensuite comme ci-dessus.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+
Tube 2 (+ placenta humain) . . . . .	+
Tube 3 (+ placenta de mouton) . . . . .	++

*Sérum 3.* — Brebis pleine. Comme ci-dessus.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+
Tube 2 . . . . .	+
Tube 3 . . . . .	++

*Sérum 4.* — Brebis pleine. Comme ci-dessus.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	+
Tube 2 . . . . .	++
Tube 3 . . . . .	+

*Sérum 5.* — Bélier. Comme ci-dessus.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	$\pm$
Tube 2 . . . . .	$\pm$
Tube 3 . . . . .	$\pm$

*Sérum 6.* — Bélier. Comme ci-dessus.

7 octobre. Réaction de l'indol :

Tube 1 (témoin) . . . . .	0
Tube 2 . . . . .	$\pm$
Tube 3 . . . . .	$\pm$

Autant qu'on puisse se faire une idée d'après ces quelques expériences, il semble que l'action protéolytique du sérum sur le placenta (humain ou ovin, ou les deux) soit assez constante chez la brebis en état de gestation. Toutefois, le terme de comparaison important — sérum de brebis non gravide — manque.

Sur trois sérum de cobaye — dont deux femelles pleines et un mâle — un sérum de femelle et celui de mâle ont donné des réactions positives avec du placenta humain.

### CONCLUSIONS

La réaction au *B. coli* fournit un moyen simple et commode de déceler la protéolyse, à condition que les albumines soumises à la digestion renferment du tryptophane. Cette méthode est d'une sensibilité supérieure à celle de la méthode de la dialyse et permet d'éliminer les diverses causes d'erreur qui entachent cette dernière.

Appliquée à l'étude de la protéolyse sérique, la réaction au *B. coli* a permis de faire les constatations suivantes :

1<sup>o</sup> Rien ne permet d'affirmer l'existence des *ferments de défense* dans le sens d'Abderhalden.

2<sup>o</sup> L'introduction parentérale d'albumines ne détermine (chez le lapin) que rarement, et d'une façon fort irrégulière, une augmentation de l'action protéolytique du sérum. L'augmentation, lorsqu'elle existe, ne présente aucune spécificité.

3<sup>o</sup> Le sérum de lapins tuberculeux ou préparés par des injections de bactéries tuberculeuses dégraissées n'exerce aucune action protéolytique vis-à-vis des bactéries tuberculeuses dégraissées.

4<sup>o</sup> Le sérum normal des diverses espèces étudiées (homme, mouton, lapin, cobaye) exerce souvent une action protéolytique nette en présence d'albumines étrangères. Mais il peut être aussi, par lui-même, le siège de phénomènes de protéolyse qui se manifestent après un temps plus ou moins long à la température de 37°.

5<sup>o</sup> Le sérum de femmes enceintes exerce une action protéolytique en présence de placenta avec une fréquence plus grande (8 à 9 fois sur 12) que celui de femmes non enceintes (2 fois sur 9). Le sérum d'homme est fréquemment protéolytique pour le placenta (3 fois sur 6).

6<sup>o</sup> Le sérum de brebis pleines a exercé une action protéolytique sur le placenta humain ou ovin, ou les deux à la fois, dans les quatre cas étudiés, alors que les deux sérums de bétail examinés se sont montrés inactifs.

Il y aurait peut-être intérêt à étendre ces recherches à l'aide de la réaction au *B. coli*, chez les grands herbivores.

## QUELQUES CONSIDÉRATIONS SUR L'HERPÈS ÉTUDE EXPÉRIMENTALE DE L'HERPÈS GÉNITAL

par GEORGES BLANC et J. CAMINOPETROS.

A la suite de nos premières recherches expérimentales sur l'herpès, recherches faites avec un virus provenant de vésicules d'herpès buccal, nous écrivions (1) que l'inoculation de virus sous la dure-mère du lapin provoque toujours une encéphalite mortelle en quelques jours (quatre-six). La constance de l'encéphalite herpétique par inoculation intracérébrale et sa courte incubation ont été confirmées par tous les savants qui ont étudié l'herpès, Dærr, Schnabel, Luger, Lauda, Levaditi, Fontana, etc.

Actuellement, après de très nombreuses expériences poursuivies depuis trois ans, nos conclusions restent les mêmes.

L'incubation moyenne de tous les cas d'encéphalite expérimentale provoqués chez le lapin par inoculation intracérébrale de virus d'herpès buccal et étudiés à notre laboratoire est de cinq à six jours. (Le chiffre moyen exact établi en tenant compte du jour d'inoculation est de 5,83.)

Certains expérimentateurs, à la vérité, ont noté des incubations beaucoup plus longues; mais il s'agit de faits isolés. C'est ainsi que Le Fèvre de Arric a observé une incubation de seize jours chez un lapin inoculé sous la dure-mère avec du virus herpétique d'origine buccale. Mais dès le second passage la durée d'incubation est tombée à cinq jours pour se fixer rapidement à trois jours (2).

Tout autre est l'intéressante observation de S. Nicolau et Poincloux (3).

Ces auteurs, en poursuivant l'étude expérimentale d'un cas d'herpès (il s'agit dans leur expérience d'herpès récidivant du

(1) *C. R. Acad. des Sciences*, p. 172, mars 1921 et *C. R. Soc. de Biol.*, 84, p. 629, 1921.

(2) LE FEVRE DE ARRIC. *C. R. Soc. de Biol.*, 87, p. 787, 1922.

(3) S. NICOLAU et POINCLOUX. *C. R. Soc. de Biol.*, 87, p. 451, 1922.

doigt), ont observé un virus à caractères différents de ceux qu'ont fait connaître les recherches des premiers expérimentateurs.

Si l'affinité de leur virus pour la cornée et pour la peau se manifeste très forte, par contre la virulence pour le névraxe paraît faible. L'encéphalite mortelle n'apparaît qu'après une incubation de dix, douze, dix-neuf et même trente-deux jours, enfin la virulence ne semble pas s'exalter mais au contraire, après quelques passages, la survie des animaux inoculés devient la règle.

L'importance d'une telle observation nous semble très grande. On sait en effet, que si Levaditi, Döerr, Schnabel ont démontré la justesse de notre hypothèse que le virus de l'herpès était identique à celui isolé par Levaditi dans l'encéphalite épidémique, d'autres expérimentateurs : Kling, Bastai, etc., ont provoqué chez le lapin, en partant du virus encéphalitique humain, une maladie expérimentale d'un type très différent de celui décrit par Levaditi.

S'agit-il de virus différents ou d'un même virus susceptible de se comporter de façons très différentes? la question reste posée. Aussi nous semble-t-il intéressant d'apporter au débat tout ce qui est de nature à compléter nos connaissances sur le comportement du virus herpétique.

En partant de cas d'herpès génital indiscutable, il nous est arrivé d'observer des faits dont quelques-uns sont superposables à ceux de Nicolau et Poincloux et d'autres renforcent encore la notion de variation de virulence du virus de l'herpès. Ce sont ces observations que nous présentons ici.

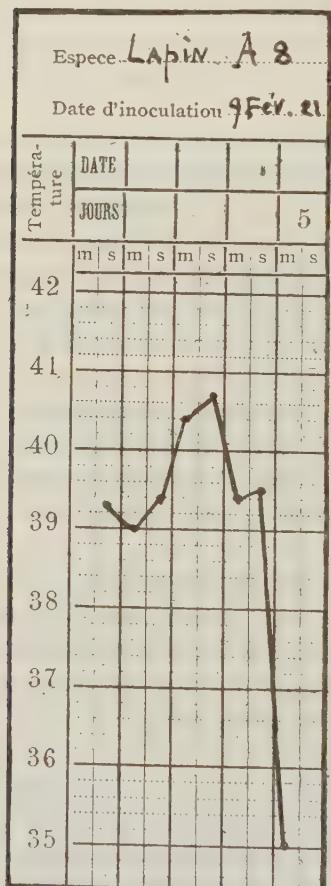
EXPÉRIENCE I (virus génital XIII), 28 mars 1923. — Herpès génital chez une femme de dix-huit ans. Nombreuses vésicules situées dans la région du pli génito-crural, à droite, reposant sur une base légèrement œdématisée et érythémateuse. Ces vésicules sont apparues il y a vingt-quatre heures; le contenu est parfaitement clair et transparent. Le contenu des vésicules est prélevé et inoculé à un lapin sur l'œil droit et sur l'œil gauche scarifiés. A l'exception du premier passage de vésicule d'herpès à lapin, où la quantité de virus est faible, la méthode d'inoculation que nous employons et qui a été suivie au cours de toutes nos expériences est brutale. La cornée et la conjonctive sont fortement scarifiées avec un couteau à cataracte, le virus est répandu abondamment à la surface des yeux et, de plus, injecté à dose élevée ( $1/2$  à  $1$  cent. cube) sous la conjonctive de la paupière supérieure. Enfin, après l'opération, l'œil est clos quelques minutes avec une pince à artères.

Le premier lapin, O. 73, inoculé le jour même du prélèvement sur les deux

yeux, fait une forte réaction marquée par de la conjonctivite, de la kératite et du pus. Il meurt d'encéphalite le 11 avril, soit le quatorzième jour de son inoculation.

Un passage du cerveau à 2 lapins commence la série qui porte finalement sur 26 lapins.

*Inoculation intracérébrale.* — Des 26 lapins, 16 sont inoculés dans le cerveau, après trépanation; 6 survivent, 10 meurent après les temps d'incubation suivants :



Courbe 1. — Encéphalite herpélique mortelle (virus d'herpès labial).

puis une kératite diffuse qui devient rapidement totale.

En même temps, la conjonctive se congestione et il se produit une abondante sécrétion de pus blanchâtre. Le bord des paupières est légèrement œdématisé. Il y a fréquemment une chute de poils pouvant s'étendre à presque toute la surface des paupières. Le plus souvent, vingt-quatre heures après

Lapin B. 38 meurt après . . . . .	5	jours
— B. 41 — . . . . .	6	—
Lapins B. 16 et B. 50 meurent après . . . . .	8	—
— B. 17 et B. 18 — . . . . .	9	—
Lapin B. 11 meurt après . . . . .	10	—
Lapins B. 6 et O. 87 meurent après . . . . .	13	—
Lapin O. 39 meurt après . . . . .	17	—

L'encéphalite provoquée par l'inoculation de virus sous la dure-mère s'accompagne toujours d'une réaction thermique marquée par une fièvre élevée et continue qui débute en général au deuxième ou troisième jour de l'inoculation et ne tombe qu'au moment de la mort.

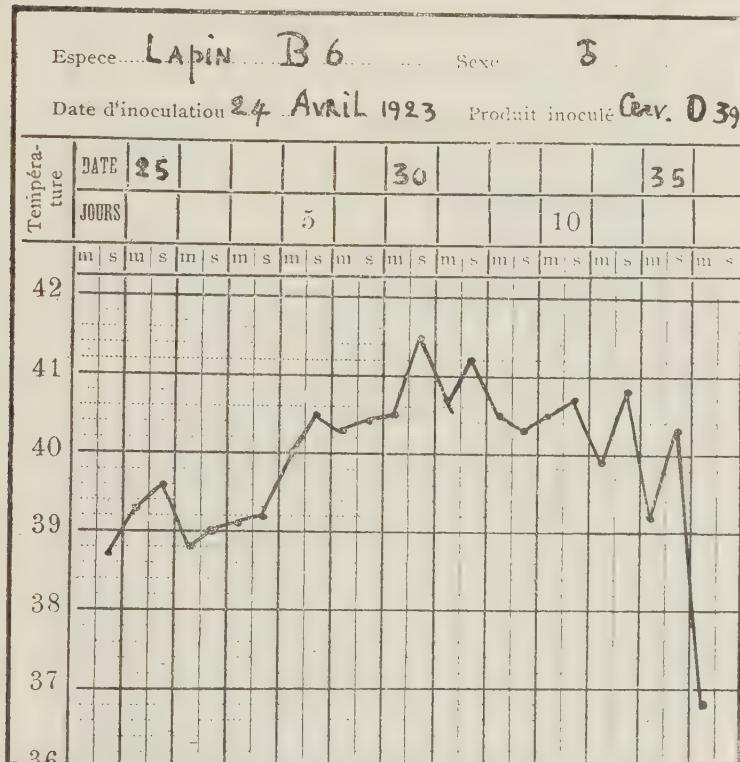
Les lapins qui résistent à l'inoculation intracérébrale font également une fièvre continue d'une dizaine de jours avec retour progressif à la normale. Les quelques courbes suivantes montrent les divers types fébriles que l'on peut observer.

#### Inoculation sur la cornée et sous la conjonctive.

L'inoculation sur la cornée du lapin, soit du contenu de vésicule d'herpès buccal, soit de la sécrétion oculaire, soit du cerveau de lapins infectés de ce même virus donne d'une façon à peu près constante, si l'inoculation est sévère, une affection de l'œil que l'on peut caractériser ainsi :

Après une incubation qui, en général, ne dépasse pas douze heures, on observe d'abord de petites vésicules qui se développent le long des traits de scarification,

l'inoculation, l'œil apparaît « collé ». Le pus est formé de leucocytes en majorité polynucléaire pseudo-éosinophiles. Enfin les complications telles que : ulcération de la cornée, hypopion, sont fréquentes. Dans les cas graves, il y a insensibilité de la cornée et de la paupière supérieure. Tous les symptômes : congestion, kératite, troubles de la sensibilité, rappellent



Courbe 2. — Encéphalite herpétique mortelle (virus d'herpès génital).

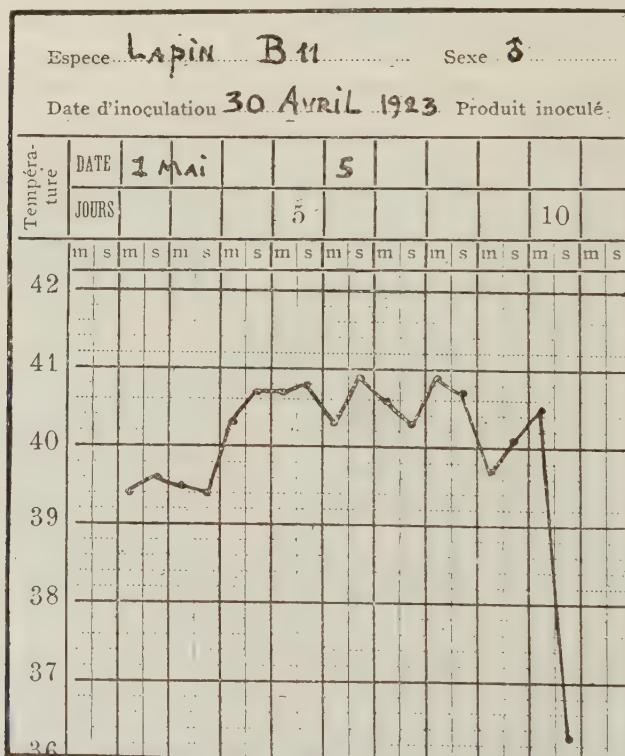
le syndrome que l'on produit par lésion de la branche ophthalmique du trijumeau.

Dans tous les cas de kérato-conjonctivite herpétique provoqués expérimentalement avec les virus des herpès génitaux qui font l'objet de cette présente étude, les phénomènes observés ne sont pas absolument superposables à ceux qui viennent d'être décrits.

Jamais la réaction intense classique n'a été notée. Même dans les cas auxquels nous attribuons la mention « réaction très forte », nous n'avons obtenu l'infection aiguë observée avec le virus de l'herpès buccal. La sécrétion de pus est tantôt presque nulle, tantôt faible, tantôt assez marquée, mais n'aboutit jamais à cette intensité si caractéristique de l'habituelle conjonctivite herpétique. L'œil est rarement « collé » et jamais sous les paupières

closes ne s'amasse ce pus abondant et sous pression qui déforme si fréquemment l'œil atteint de kérato-conjonctivite herpétique à virus buccal.

La kératite est également moins intense, diffuse et généralisée, elle aboutit plus rarement à de graves lésions et cela toujours malgré de très sévères inoculations. La cicatrisation se fait rapidement. En somme : conjonctivite peu intense, kératite moins forte caractérisent les lésions expérimentales de



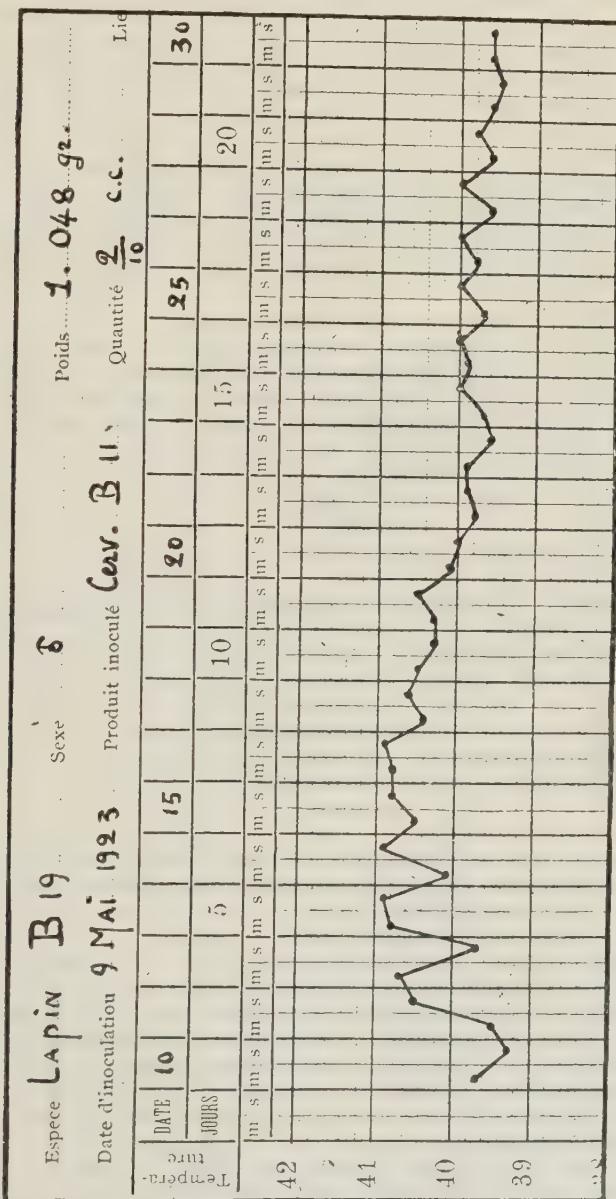
Courbe 3. — Encéphalite herpétique mortelle (virus d'herpès génital).

ces virus qui rappellent beaucoup les kérato-conjonctivites du virus salivaire, type non encéphalotogène, de Levaditi et surtout la kérato-conjonctivite provoquée par les virus salivaires que nous avons isolés de la salive de différents animaux domestiques (1).

Nous avons inoculé 17 lapins sur les yeux avec le virus génital XIII, tous ont réagi par une fièvre élevée, mais aucun, à l'exception du premier de la série, n'est mort d'encéphalite.

(1) G. BLANC, J. CAMINOPETROS et MELANIDIS, Recherches expérimentales sur les virus salivaires. *C. R. Soc. de Biol.*, 86, p. 557, 1922 et *Archives de l'Institut Pasteur hellénique*, 1, no 1, p. 68, 1923.

L'intensité de la réaction cornéenne des lapins inoculés ne permet pas de préjuger de la virulence pour le névrate.



Courbe 4. — Encéphalite herpétique non-mortelle (virus d'herpès génital).

En effet, 8 des lapins inoculés sous la dure-mère et qui ont été en même temps inoculés sur les yeux, nous ont donné les résultats suivants :

Lapin B. 11, réaction légère . . . . .	Mort au 10 <sup>e</sup> jour.
— B. 19, très faible réaction. . . . .	Survie.
— B. 6, réaction presque nulle . . . . .	Mort au 13 <sup>e</sup> jour.
— B. 18, très légère réaction . . . . .	— 9 <sup>e</sup> jour.
— B. 21, forte réaction C. P. K. (1). . . . .	Survie.
— B. 17, très légère réaction . . . . .	Mort au 9 <sup>e</sup> jour.
— B. 50, assez forte réaction . . . . .	— 8 <sup>e</sup> jour.
— B. 52, réaction moyenne . . . . .	Survie.

Par conséquent, un animal inoculé dans le cerveau et sur la cornée avec le même virus peut survivre et cependant présenter une forte réaction oculaire alors, qu'au contraire, la mort par encéphalite peut se produire sans que la cornée ait réagi fortement.

Les tableaux suivants donnent la filiation du virus et résument l'histoire des lapins inoculés.

**EXPÉRIENCE II (virus génital XVI).** — Herpès vulvaire. Petits placards de vésicules à liquide clair siégeant sur le bord et la face interne des grandes lèvres chez une femme de vingt ans, syphilitique et atteinte de blennorragie.

Le liquide des vésicules, recueilli le 28 mai 1923, est inoculé sur les deux yeux du lapin B. 28, le premier d'une série de 11 passages.

De ces 11 lapins, 4 sont inoculés dans le cerveau, 2 meurent, 2 survivent. La mort survient une fois au sixième jour (lapin B. 27) une fois au onzième jour (lapin B. 53).

Les courbes de température sont du type à fièvre continue signalé plus haut.

La réaction des yeux, toujours inoculés aussi sévèrement, est du type que nous avons décrit à propos du virus XIII. La sécrétion de pus est toujours faible et de courte durée. La kérato-conjonctivite s'accompagne de fièvre. La survie est la règle. Sur 7 lapins inoculés sur la cornée et sous la conjonctive, 1 seul est mort, sans symptômes cliniques d'encéphalite et sans que le passage effectué avec son cerveau ait permis d'affirmer que la mort était bien due à l'inoculation de virus d'herpès sur la cornée.

Le détail des passages et des expériences est exposé dans les tableaux I, II et III.

**EXPÉRIENCE III (virus génital XVII).** — Quelques vésicules à liquide clair siégeant au-dessous des grandes lèvres, sur la fesse gauche d'une femme de vingt-cinq ans. L'éruption, qui est la première manifestation d'herpès observée par la malade, date de deux jours.

Le liquide des vésicules, recueilli le 30 juillet 1923, est inoculé sur l'œil gauche du lapin B. 62 qui commence une série de huit passages sur lapins.

De ces lapins, 5 sont inoculés dans le cerveau, les 5 meurent avec des incubations généralement courtes. L'un meurt au cinquième jour (B. 81), l'autre au sixième (B. 97), un troisième meurt au septième (B. 68), un quatrième au huitième (B. 92) et enfin le cinquième au dixième jour (B. 97).

Les courbes de température sont du type à fièvre continue comme dans les expériences précédentes.

Les réactions des yeux sont toujours fortes, mais en général le pus est peu abondant; dans un cas cependant, le huitième de la série, la conjoncti-

(1) C. P. K., abréviation pour conjonctivite, pus, kératite.

vite est intense, le pus abondant et la kérato-conjonctivite tout à fait du type herpès buccal.

Les tableaux IV, V et VI donnent les passages et le détail des expériences.

Étant donné le type particulier de réaction expérimentale qu'ont donné les virus d'herpès génital étudiés et en particulier le virus XIII, il était nécessaire d'établir leurs rapports avec le type classique que donne le virus d'herpès buccal. Seule la réaction d'immunité pouvait trancher la question de l'identité ou non des deux herpès.

Nous avons montré que l'inoculation de la cornée confère au lapin une immunité très forte du névraxie (1) vis-à-vis du virus de l'herpès. Nous avons utilisé ce fait pour éprouver une partie de nos lapins, inoculés sur l'œil avec du virus d'herpès génital ou ayant résisté à une inoculation sous-duremérienne de même virus, en les réinoculant dans le cerveau avec un virus d'herpès buccal éprouvé. Les épreuves ont compris deux séries d'expériences.

**EXPÉRIENCE IV.** — Le 24 août 1923, le lapin B. 78 meurt. Ce lapin a été inoculé le 20 août sous la dure-mère avec le cerveau d'un lapin B. 73 mort d'encéphalite herpétique (virus buccal XIX). Le cerveau est broyé dans de l'eau physiologique de manière à donner une émulsion laiteuse. Cette émulsion est utilisée pour l'inoculation des lapins suivants, dans le cerveau.

B. 2 inoculé sur O. D. et O. G. le 16 avril 1923 avec virus herpès génital XIII.					
B. 8	—	—	26 avril 1923	—	—
B. 49	—	—	19 juin 1923	—	—

(Voir suite page 163.)

(1) G. BLANC et J. CAMINOPETROS, Recherches expérimentales sur l'herpès. *C. R. Soc. de Biol.*, 84, p. 767, 1921.

TABLEAU I. — Passages.

**HERPÈS GÉNITAL ♀.**

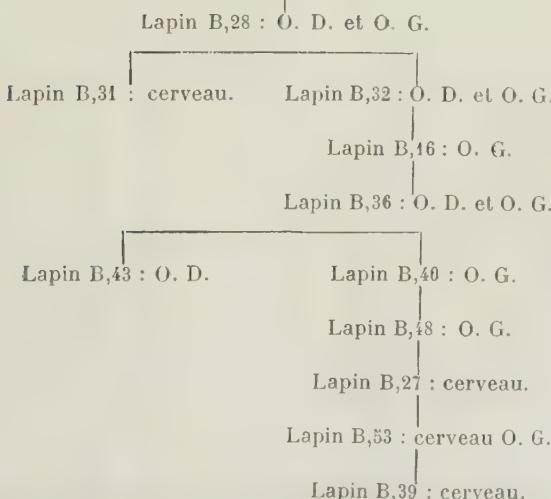


TABLEAU II. — Histoire des lapins inoculés.

NUMÉROS des lapins	DATE d'inoculation	NATURE et origine du virus	LIEU d'inoculation	RÉACTION OCULAIRE	RÉACTION GÉNÉRALE ET OBSERVATIONS
Q,73 . . .	28 mars 1923.	Vésicule d'herpès génital.	Oeil droit, œil gauche.	Forte C. K. P.	Fièvre continue. Mort le quatorzième jour, 11 avril 1923.
Q,39 . . .	31 mars 1923.	Virus oculaire de Q,73.	Sous la dure-mère.	"	Fièvre continue. Mort le dix-septième jour, 16 avril 1923.
B,2 . . .	16 avril 1923.	Cerveau O,39.	Oeil droit, œil gauche.	Peu intense, puis très peu abondant.	Pas de fièvre. Éprouvé le 24 avril 1923 avec du virus d'herpès buccal. Mort d'encéphalite le neuvième jour.
B,8 . . .	26 avril 1923.	Cerveau O,39.	Oeil droit, œil gauche.	Réaction très faible.	Pas de fièvre. Éprouvé le 4 mai 1923 avec du virus d'herpès buccal. Mort le neuvième jour.
B,6 . . .	24 avril 1923.	Cerveau O,39.	Sous la dure-mère et œil droit.	Réaction presque nulle.	Réaction fébrile. Mort le treizième jour, 6 mai 1923.
B,17 . . .	7 mai 1923.	Cerveau B,6.	Sous la dure-mère, œil droit et œil gauche.	Très légère réaction.	Réaction fébrile. Mort le neuvième jour, 16 mai 1923.
B,48 . . .	7 mai 1923.	Cerveau B,6.	Sous la dure-mère, œil droit et œil gauche.	Très légère réaction.	Réaction fébrile. Mort le neuvième jour, 15 mai 1923.
B,21 . . .	15 mai 1923.	Cerveau B,48.	Sous la dure-mère, œil droit et œil gauche.	Forte réaction.	Réaction fébrile. Survie.
B,38 . . .	7 juin 1923.	Cerveau B,47.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Mort le cinquième jour, 4 juin 1923.

11 juil 1923.

B,16. . .	12 juin 1923.	Cerveau B,38. Sous la dure-mère.	"	Faible réaction fébrile. Mort le huitième jour, 19 juin 1923.
B,49. . .	13 juin 1923.	Cerveau B,44. Œil droit, œil gauche.	Très légère réaction.	Réaction fébrile. Éprouvé le 24 juin 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Mort le sixième jour.
B,50. . .	19 juin 1923.	Cerveau B,46. Sous la dure-mère et œil gauche.	Réaction nette, peu de pus.	Réaction fébrile. Mort le huitième jour, 26 juin 1923.
B,52. . .	27 juin 1923.	Cerveau B,50. Sous la dure-mère et œil gauche.	Réaction nette, peu de pus.	Réaction fébrile. Éprouvé le 24 août 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.
O,90. . .	31 mars 1923.	Virus oculaire Œil droit, œil gauche de O,73.	Réaction moyenne, kératite bien marquée, peu de pus.	Pas de réaction fébrile. Éprouvé le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.
O,94. . .	4 avril 1923.	Virus oculaire Œil droit, œil gauche de O,90.	Réaction moyenne, kératite bien marquée, peu de pus.	Réaction fébrile faible. Éprouvé le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.
O,97. . .	7 avril 1923.	Virus oculaire Œil droit, œil gauche de O,94.	Forte réaction, puis assez abondant,	Réaction fébrile.
O,100 . . .	10 avril 1923.	Virus oculaire Sous la dure-mère. de O,97.	"	Réaction fébrile. Éprouvé le 24 août 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.

N°MÉROS des lapins	DATE d'inoculation	NATURE et origine du virus	LIEU d'inoculation	RÉACTION OCULAIRE	RÉACTION GÉNÉRALE ET OBSERVATIONS
B,1 . . .	10 avril 1923.	Virus oculaire de O,97.	Œil droit, œil gauche.	Légère réaction.	Réaction fébrile. Eprouvé le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Mort.
O,87. . .	13 avril 1923.	Virus oculaire B,4.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Mort le treizième jour. 25 mars 1923.
O,86. . .	13 avril 1923.	Virus oculaire B,4.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Eprouvé le 24 août 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.
B,7 . . .	25 avril 1923.	Cerveau O,87.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Sacrifié le sixième jour.
B,11. . .	30 avril 1923.	Cerveau B,7.	Sous la dure-mère et œil droit.	Légère réaction.	Réaction fébrile. Meurt le dixième jour. 9 mai 1923.
B,19. . .	9 mai 1923.	Cerveau B,11.	Sous la dure-mère et œil droit.	Très faible réaction.	Réaction fébrile. Mort accidentelle le 21 juin 1923.
B,3 . . .	28 avril 1923.	Cerveau O,87.	Œil droit, œil gauche.	Très faible réaction.	Réaction fébrile. Eprouvé le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Mort le sixième jour.
B,45. . .	5 mai 1923.	Virus oculaire B,5.	Œil droit, œil gauche.	Très légère réaction.	Faible réaction thermique.

## L'HERPÈS GÉNITAL

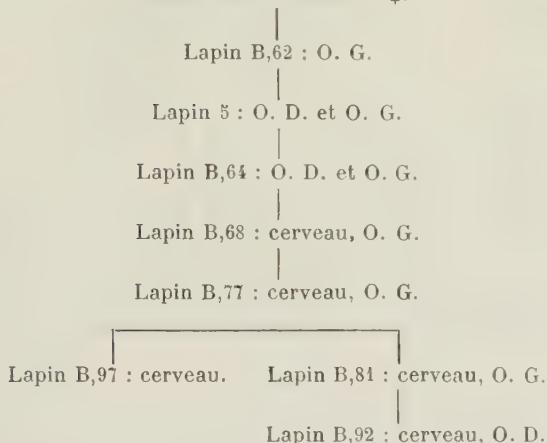
TABLEAU III. — Passages.  
HERPÈS GÉNITAL ♀.

Lapin O,39 : cerveau.		Lapin O,90 : O. D. et O. G.
	Lapin B,2 : O. D. et O. G.	Lapin B,8 : O. D. et O. G.
Lapin B,6 : cerveau et O. D.		Lapin O,94 : O. D. et O. G.
	Lapin B,47 : O. D. et O. G.	Lapin O,97 : O. D. et O. G.
Lapin B,48 : cerveau, O. D. et O. G.	Lapin O,400 : cerveau.	Lapin B,1 : O. D. et O. G.
Lapin B,38 : cerveau.	Lapin B,21 : cerveau, O. D. et O. G.	Lapin O,86 : cerveau.
Lapin B,44 : cerveau.	Lapin B,46 : cerveau.	Lapin O,87 : cerveau.
Lapin B,49 : cerveau.	Lapin B,50 : cerveau, O. G.	Lapin B,7 : cerveau,
		Lapin B,5 : O. D. et O. G.
Lapin B,52 : cerveau, O. G.		Lapin B,43 : O. D. et O. G.
		Lapin B,11 : cerveau, O. D.
		Lapin B,19 : cerveau.

TABLEAU IV. — Histoire des lapins inoculés.

NOMBRES des lapins	DATE d'inoculation	NATURE et origine du virus	LIEU d'inoculation	RÉACTION OCULAIRE		RÉACTION GÉNÉRALE ET OBSERVATIONS
				RÉACTION	OCULAIRE	
B,28. . .	28 mai 1923.	Sérosité d'herpès génital.	Œil droit, œil gauche.	Réaction très forte et courte.	Réaction fébrile. Eprouvée le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.	
B,31. . .	30 mai 1923.	Virus oculaire de B,26.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Survie.	
B,32. . .	30 mai 1923.	Virus oculaire B,28.	Œil droit, œil gauche.	Réaction faible.	Réaction faible.	
B,41. . .	2 juin 1923.	Virus oculaire B, 32.	Œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile. Eprouvée le 3 septembre 1923 sous la dure-mère avec du virus d'herpès buccal. Survie.	
B,36. . .	6 juin 1923 et 7 juin 1923.	Virus oculaire B,40.	Œil droit, œil gauche.	(Œil) gauche, faible réaction. Œil droit, très faible réaction.	Réaction fébrile courte. Mort le neuvième jour, le passage reste doux.	
B,43. . .	14 juin 1923.	Cerveau B,36.	Œil droit.	Réaction presque nulle.	"	
B,40. . .	14 juin 1923.	Virus oculaire B,36.	Œil gauche.	Réaction marquée, sans pus.	Réaction fébrile légère.	
B,48. . .	16 juin 1923.	Virus oculaire B,40.	Œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile.	
B,27. . .	23 juin 1923.	Virus oculaire B,48.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Mort le sixième jour, 28 juin 1923.	
B,53. . .	28 juin 1923.	Cerveau B,27.	Dans le cerveau et sur l'œil gauche.	Forte réaction.	Réaction fébrile. Mort le onzième jour, 8 juillet 1923.	
B,39. . .	9 juillet 1923.	Cerveau B,35.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile légère. Survie.	

TABLEAU V. — Passages.

**HERPÈS GÉNITAL ♀.**

B. 52 inoculé sous la dure-mère et sur l'œil gauche le 27 juin 1923 avec le virus d'herpès génital XIII.  
 O. 100 inoculé sous la dure-mère le 10 avril 1923 avec le virus d'herpès génital XIII.  
 O. 86 inoculé sous la dure-mère le 13 avril 1923 avec le virus d'herpès génital XIII.  
 B. 39 inoculé sous la dure-mère le 9 juillet 1923 avec le virus d'herpès génital XVI.  
 B. 82 Lapin neuf témoin.

Chaque lapin reçoit dans le cerveau  $\frac{2}{40}$  de cent. cube de l'émulsion. L'injection est faite par perforation de l'orbite de l'œil gauche à la partie postéro-externe de l'arcade orbitaire avec une aiguille fine.

Le résultat des inoculations d'épreuve est le suivant :

- B. 39 meurt le 25 août (shocké).
- Le témoin B. 82 meurt le 27 août 1923 d'encéphalite (4<sup>e</sup> jour).
- B. 2 meurt le 1<sup>er</sup> septembre 1923 d'encéphalite (9<sup>e</sup> jour).
- B. 8 — le 1<sup>er</sup> septembre 1923 — (9<sup>e</sup> jour).
- B. 49 — le 29 août 1923 d'encéphalite (6<sup>e</sup> jour).
- B. 52 survit.
- O. 100 survit.
- O. 86 survit.

**EXPÉRIENCE V.** — Le 3 septembre 1923, le cerveau du lapin B. 83, mort le 1<sup>er</sup> septembre d'encéphalite herpétique (virus buccal XIX) conservé en eau physiologique, à la glacière, en ampoules, est utilisé pour une seconde expérience d'épreuves.

TABLEAU VI. — Histoire des lapins inoculés.

NUMÉROS des lapins	DATE d'inoculation	NATURE et origine du virus	LIEU d'inoculation	RÉACTION OCULAIRE	RÉACTION GÉNÉRALE ET OBSERVATIONS
B,62. . .	30 juillet 1923.	Vésicule d'herpes génital.	Œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile.
5 . . .	2 août 1923.	Virus oculaire	Œil droit, œil gauche. B,62.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile.
B,64. . .	4 août 1923.	Virus oculaire à	Œil droit, œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile.
B,68. . .	10 août 1923.	Virus oculaire	Sous la dure-mère et œil gauche. B,64.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile. Mort le septième jour, 16 août 1923.
B,77. . .	16 août 1923.	Cerveau B,68.	Dans le cerveau et œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile. Mort le dixième jour, 25 août 1923.
B,91. . .	6 septembre 1923.	Cerveau B,77.	Sous la dure-mère.	"	Réaction fébrile. Mort le sixième jour, 11 septembre 1923.
B,81. . .	25 août 1923.	Cerveau B,77.	Dans le cerveau et œil gauche.	Réaction assez forte.	Réaction fébrile. Mort le cinquième jour, 29 août 1923.
B,92. . .	1er septembre 1923.	Cerveau B,84.	Dans le cerveau et œil droit.	Forte réaction, puis abondant.	Réaction fébrile. Mort le huitième jour, 8 septembre 1923.

Nous inoculons dans le cerveau, par la voie orbitaire avec  $\frac{2}{10}$  de cent. cube, les lapins suivants :

O. 90	inoculé le 31 mars 1923 sur O. D. et O. G.	avec virus herpès génital XIII.
O. 94	— 4 avril 1923	— — —
B. 1	— 10 avril 1923	— — —
B. 5	— 28 avril 1923	— — —
B. 28	— 28 mai 1923	— — —
B. 10	— 2 juin 1923 sur l'O. G. avec virus herpès génital XVI.	XVI.

Le résultat des inoculations d'épreuves est le suivant :

O. 90 survit.

O. 94 survit.

B. 1 meurt le 7 septembre 1923 d'encéphalite (5<sup>e</sup> jour).

B. 5 — le 8 septembre 1923 — (6<sup>e</sup> jour).

B. 28 survit.

B. 10 survit.

De ces deux séries d'expériences nous voyons que le virus le plus faible, XIII, donne cependant constamment l'immunité par infection cérébrale, directe, non suivie de mort et seulement dans un quart des cas par infection de la cornée. Le virus XVI, par contre, confère l'immunité au névraxe par simple infection oculaire. Le résultat d'ensemble nous montre que, quelle que soit la virulence de ces virus herpétiques génitaux, il s'agit bien toujours du virus de l'herpès tel que nous l'ont fait connaître les recherches expérimentales faites avec le virus de l'herpès buccal.

#### RÉSUMÉ ET CONCLUSIONS.

Les quelques observations que nous avons tirées de nos recherches personnelles montrent que si l'herpès génital rentre bien dans la grande famille de l'herpès comme cela a été déjà rapporté par nous-mêmes et par d'autres expérimentateurs, il peut se présenter parfois avec des caractères en apparence très aberrants de ceux qu'ont établis les premières recherches sur le virus de l'herpès buccal.

On pourrait comparer ces caractères expérimentaux de l'herpès génital à ceux décrits par Nicolau et Poincloux dans un cas d'herpès récidivant du doigt pour caractériser un type d'herpès extra-buccaux à virulence moindre pour le névraxe et souvent moindre pour la cornée. Nous pensons qu'une telle

conclusion ne peut se tirer d'observations encore très peu nombreuses. Ce qui nous paraît plus intéressant à faire ressortir, c'est la grande variabilité des réactions expérimentales que présente le lapin à l'inoculation de l'ultra-virus de l'herpès. Cette variabilité est telle qu'il nous semble légitime de conclure que nous ne sommes pas en droit de séparer et d'opposer les différents types de virus isolés de l'encéphalite épidémique, sur la seule évolution de l'encéphalite et de la kératite expérimentales du lapin.

## **ROLE DE LA PEAU DANS L'INFECTION ET L'IMMUNITÉ CHARBONNEUSE**

par HARRY PLOTZ.

Dans une communication de Besredka (1), concernant le rôle de la peau dans l'infection et l'immunité charbonneuse, cet auteur conclut que le cobaye est réfractaire à l'inoculation du charbon par toute autre voie que la voie cutanée et qu'il ne peut être infecté par cette maladie que si la bactéridie est mise en contact avec la peau.

Des expériences faites par Besredka, il résulte qu'à la cuti-infection répond la cuti-immunité et que la vaccination de la peau est le seul moyen de conférer au cobaye une immunité locale qui s'étend à l'organisme de l'animal tout entier.

Nous souvenant de ces conclusions, nous avons fait différentes expériences dans le but de déterminer : 1<sup>o</sup> si les lapins étaient susceptibles de contracter l'infection charbonneuse quand le virus était introduit sous la peau ; 2<sup>o</sup> si l'animal qui avait survécu à cette sorte d'inoculation était immunisé ; 3<sup>o</sup> si l'animal cutivacciné acquiert réellement l'immunité.

Pour accomplir la première partie de ce travail, nous avons placé, sous la peau des lapins, des capsules contenant une culture charbonneuse, et à divers intervalles, nous avons libéré la culture en brisant les capsules. (Les capsules dont nous nous sommes servi ont été de différentes sortes : en gélatine, en collodion, en caoutchouc ou en verre ; c'est avec les capsules de verre très mince que nous avons obtenu les meilleurs résultats.)

Pour cette série d'expériences, faites seulement sur des lapins, nous avons employé 75 animaux.

Les cultures de bacilles charbonneux dont nous nous sommes servi provenaient d'une vache morte de charbon. Craignant que les réensemencements de la culture n'aient une tendance

(1) *Ces Annales*, juillet 1921, 35, p. 421 ; voir *C. R. Soc. Biologie*, t. XXXIII, 29 mai 1920, p. 769.

à réduire sa virulence, nous avons employé le procédé suivant pour maintenir la virulence à un niveau constant pendant tout le cours des expériences. La culture d'origine était une culture sur gélose de vingt-quatre heures à 37° C., placée ensuite dans la glacière à 4° C. C'est dans cette culture sur gélose que nous prélevions la semence pour chaque nouvelle expérience. Tous les animaux étaient toujours inoculés avec une culture en bouillon de vingt-quatre heures. La culture d'origine était réensemencée sur gélose environ tous les quinze jours et sa virulence était essayée, à des intervalles variés, par des inoculations d'une dilution de culture d'origine de vingt-quatre heures, dans la peau des lapins.

Pendant tout le temps qu'ont duré les expériences, la culture employée s'est maintenue à un haut degré de virulence, ainsi que le démontre le tableau suivant :

18 avril . . . .	0,1 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 20 avril, mort du charbon (1).
18 avril . . . .	0,01 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 20 avril, mort du charbon.
21 avril . . . .	0,001 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 23 avril, mort du charbon.
21 avril . . . .	0,001 cent. cubes (répété) d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 23 avril, mort du charbon.
1 <sup>er</sup> juin. . . .	0,01 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 5 juin, mort du charbon.
1 <sup>er</sup> juin. . . .	0,001 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 5 juin, mort du charbon.
17 juillet . . . .	0,002 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 22 juillet, mort du charbon.
4 août . . . .	0,001 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 8 août, mort du charbon.
4 août . . . .	0,002 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 8 août, mort du charbon.
9 août . . . .	0,001 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 14 août, mort du charbon.
18 novembre. .	0,001 cent. cube d'une culture d'origine de vingt-quatre heures, injectée dans la peau. 23 novembre, mort du charbon.

On peut conclure de ceci que 0,001 cent. cube d'un bouillon de culture charbonneuse de vingt-quatre heures injecté dans

(1) On reconnaît la mort par infection charbonneuse par l'apparition d'un œdème typique, local ou étendu, avec présence de bacilles charbonneux dans l'exsudat et dans le sang du cœur.

la peau d'un lapin a amené la mort de l'animal avec infection typique et a conservé un haut degré de virulence vis-à-vis du lapin pendant tout le temps qu'ont duré les expériences.

Pour préparer les capsules introduites sous la peau, nous employions le procédé suivant : nous nous servions toujours de culture en bouillon de vingt-quatre heures à 37° C., et, sauf exception que nous signalons plus loin, chaque capsule contenait 1 cent. cube de ce bouillon.

Les capsules de gélatine étaient remplies avec soin, de façon qu'aucune partie du liquide ne pût s'échapper ; après avoir entré l'un dans l'autre les deux morceaux de la capsule, nous les scellions avec du collodion. La capsule entière était alors trempée pendant quinze minutes dans de l'alcool à 95 p. 100 et lavée rapidement dans l'eau physiologique.

Pour les capsules de verre, après les avoir remplies et scellées, nous les trempions dans la teinture d'iode pendant vingt minutes et ensuite nous les lavions dans l'alcool et dans l'eau physiologique. Nous avons essayé de préparer des capsules en verre aussi mince que possible ; une telle capsule, quand elle est bien faite, doit se résoudre, lorsqu'on la brise, en une poudre très fine.

Naturellement, ces capsules sont très difficiles à bien faire, et nous devons convenir que beaucoup de nos animaux sont morts du charbon parce qu'ils ont été blessés lorsqu'on a brisé les capsules, la peau n'étant pas encore cicatrisée.

Pour introduire les capsules sous la peau, nous procédions ainsi : la peau était épilée sur une petite surface dans le milieu du dos et lavée à l'alcool en prenant grand soin de produire aussi peu d'irritation que possible. Une incision d'environ 5 centimètres de longueur était faite parallèlement à l'épine dorsale et la capsule était introduite sous la peau. La plaie était recousue de manière à assurer une rapide cicatrisation. Les lapins étaient examinés chaque jour pour vérifier l'état de la blessure et s'assurer que la capsule était encore intacte.

Le tableau suivant représente les observations faites sur 45 lapins sous la peau desquels on avait placé des capsules qui ont été brisées à des intervalles différents :

NOMBRE de lapins	NATURE de la capsule	QUANTITÉ de culture contenue dans chaque capsule en cent. cubes	NOMBRE de jours après lesquels la capsule insérée a été cassée	RÉSULTATS
1	Verre.	1,0	Cassée sur la plaie au mo- ment de l'insertion.	Mort du charbon.
7	Gélatine.	0,2-0,8	Dissoute environ en quinze minutes.	—
2	Verre.	1,0	5 heures.	—
2	—	—	24 —	—
3	—	—	2 jours.	—
1	—	—	3 —	—
4	—	—	4 —	—
3	—	—	4 —	Vivants.
1	—	3,0	4 —	—
1	—	—	4 —	Mort du charbon.
3	—	1,0	5 —	—
4	—	1,0	5 —	Vivants.
7	—	—	6 —	Morts du charbon.
5	—	—	6 —	Vivants.
1	—	—	15 —	Vivant.

Dans cette série, il est à noter que, sur 16 lapins dans lesquels les capsules se brisèrent d'elles-mêmes ou furent brisées à diverses périodes pendant les trois premiers jours, 100 p. 100 moururent du charbon. Sur 29 lapins dans lesquels les capsules furent cassées entre le quatrième et le quinzième jour inclusivement, 52 p. 100 moururent et 48 p. 100 demeurèrent vivants.

En ce qui concerne l'état de la plaie pendant la période qui suivait l'insertion de la capsule, on pouvait, à l'examen, s'apercevoir que, en moyenne, les blessures commençaient à se fermer environ vers le quatrième jour et se cicatrisaient rapidement pendant les jours suivants.

Cette série d'expériences démontre donc que quand la peau est guérie et que les bactéries ne peuvent plus entrer en contact avec la plaie, la possibilité d'infection se trouve diminuée.

Comme nous l'avons dit plus haut, nous pensons que, si nous avions pu nous procurer des capsules de verre d'une fabrication parfaite et d'une finesse uniforme, nous aurions obtenu des

résultats plus frappants, car nous sommes certain que beaucoup de nos lapins sont morts du charbon parce que la peau a été déchirée au moment où nous avons cassé nos capsules.

D'après le tableau ci-dessus, nous voyons encore que 13 lapins ont résisté à l'introduction de 1 cent. cube d'un bouillon de culture de bacilles charbonneux introduit sous la peau, et 1 lapin a résisté à 3 cent. cubes de virus. Ce résultat est des plus frappants si l'on considère que 0,001 cent. cube de la même culture inoculée dans la peau d'un lapin cause la mort de cet animal par infection charbonneuse.

Nous avons voulu savoir si le fait de laisser la culture dans une capsule scellée, à la température du lapin, n'était pas de nature à diminuer la virulence de cette culture. Pour nous en assurer, nous avons fait l'expérience suivante :

Une capsule contenant 1 cent. cube d'un bouillon de culture de vingt-quatre heures, qui était restée pendant six jours sous la peau d'un lapin, a été retirée et sa virulence a été essayée avec les résultats que voici :

7 juin . . . 0,01	cent. cube injecté dans la peau.	11 juin, mort du charbon.
7 juin . . . 0,002	—	—
7 juin . . . 0,001	—	12 juin, —
7 juin . . . 0,001	(Nouvelle dilution répétée).	12 juin, —

Les résultats qui précèdent démontrent qu'il est possible d'introduire une grande quantité d'une culture charbonneuse virulente sous la peau d'un lapin, sans le tuer, pourvu que la peau soit intacte.

Des résultats semblables ont été obtenus par Balteano (1). Cet auteur a introduit sous la peau de 3 lapins des capsules contenant 0 c. c. 3 d'une épaisse culture de vingt-quatre heures sur gélose, qui a été libérée sous la peau. Sur ces 3 lapins, 2 ont survécu et 1 est mort du charbon. Balteano a aussi employé 3 cobayes de la même manière; tous les trois ont survécu.

Combiesco (2) convient que l'inoculation sous la peau ne produit pas l'infection charbonneuse chez les cobayes et les lapins, mais il fait cette réserve que cela est vrai, surtout quand

(1) *Ces Annales*, novembre 1923, **36**, p. 805.

(2) *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, p. 640.

NUMÉROS DES LAPINS	DATE d'insertion de la capsule	NATURE ET QUANTITÉ de culture	DATE de la brisure de la capsule	NOMBRE de jour
41 . . . . .	5 avril.	Verre 3 cent. cubes.	9 avril.	4
29 . . . . .	21 avril.	Verre 1 cent. cube.	23 avril.	4
26 . . . . . 26 (témoin) . . .	9 avril.	Verre 1 cent. cube.	14 avril.	5
20 . . . . .	9 avril.	Verre 1 cent. cube.	14 avril.	5
17 . . . . .	9 avril.	Verre 1 cent. cube.	14 avril.	5
60 . . . . .	1 <sup>er</sup> juin.	Verre 1 cent. cube.	7 juin.	6
72 . . . . .	14 juin.	Verre 1 cent. cube.	20 juin.	6
67 . . . . .	14 juin.	Verre 1 cent. cube.	29 juin.	15
57 . . . . .	1 <sup>er</sup> juin.	Verre 1 cent. cube.	7 juin.	6
88 . . . . . 88 (témoin) . . .	3 juillet.	Verre 1 cent. cube.	9 juillet.	6
100 . . . . . 100 (témoin) . . .	7 juillet.	Verre 1 cent. cube.	11 juillet.	4
A 90 . . . . . A 90 (témoin) . . .	9 juillet.	Verre 1 cent. cube.	15 juillet.	6
49 . . . . . 49 (témoin) . . .	9 avril.	Verre 1 cent. cube.	14 avril.	5
97 . . . . .	7 juillet.	Verre 1 cent. cube.	17 juillet.	4

RÉSULTATS	RÉINOCULATION en centimètres cubes	DATE	RÉSULTATS
vivant le 7 mai.	0,5 dans la peau.	7 mai.	Mort du charbon le 11 mai.
vivant le 7 mai.	0,5 dans la peau.	7 mai.	Mort du charbon le 10 mai.
vivant le 11 mai.	0,1 dans la peau.	11 mai.	Mort du charbon le 15 mai. Mort du charbon le 14 mai.
vivant le 30 avril.	0,1 dans la peau.	30 avril.	Mort du charbon le 5 mai.
vivant le 24 avril.	0,01 dans la peau.	24 avril.	Vivant le 2 juillet.
vivant le 16 juin.	0,01 dans la peau.	16 juin.	Mort du charbon le 19 juin.
vivant le 27 juillet.	0,01 dans la peau.	27 juin.	Mort du charbon le 30 juin.
vivant le 10 juillet.	1/300° dans la peau.	10 juillet.	Mort du charbon le 12 juin.
vivant le 16 juin.	0,002 dans la peau.	16 juin.	Vivant le 2 juillet.
vivant le 17 juillet.	0,002 dans la peau.	17 juillet.	Mort du charbon le 21 juillet. Mort du charbon le 22 juillet.
vivant le 17 août.	0,002 dans la peau.	17 août.	Vivant le 15 septembre. Mort du charbon le 30 août.
vivant le 20 novembre.	1/600° dans la peau.	20 novembre.	Vivant le 30 novembre. Mort du charbon le 23 novembre.
vivant le 21 avril.	0,001 dans la peau.	21 avril.	Vivant le 11 mai. Mort du charbon le 25 avril.
vivant le 9 août.	0,001 dans la peau.	9 août.	Mort du charbon le 14 août.

le virus injecté ne dépasse pas une certaine quantité. Cet auteur dit que si la dose est très forte, l'animal meurt malgré toutes les précautions prises pour éviter l'infection de la peau et il cite une expérience faite sur quatre lapins, qui ont reçu 0 c. c. 1, 0 c. c. 05, 1 et 2 cent. cubes d'une émulsion de vingt-quatre heures sur gélose dans 10 cent. cubes d'eau physiologique. Les deux premiers lapins ont survécu et les deux autres sont morts. D'après les expériences que nous avons faites, nous pensons que Combiesco doit avoir souillé la peau des deux derniers lapins avec la culture et, de cette façon, provoqué l'infection.

Dans une note récente, Bachmann, Beltrami et Romat (1) déclarent avoir provoqué le charbon mortel chez les lapins inoculés dans les veines ou sous la peau, en dépit des précautions minutieuses (cautérisation jusqu'à la destruction de la peau et du cartilage) prises pour éviter de contaminer la peau. Ils attribuent ce résultat à la nature des souches employées. Nous sommes porté à l'attribuer à la nature des précautions prises. Comme il ressort de nos expériences, tant que la peau n'est pas complètement cicatrisée, à la suite de l'introduction du virus contenu dans les capsules, l'infection charbonneuse est inévitable. Or, le traumatisme que subissent les lapins des auteurs, aussitôt l'inoculation faite, est trop récent pour ne pas favoriser l'éclosion du charbon.

Il est maintenant démontré que les lapins peuvent survivre à la libération d'une grande quantité de culture charbonneuse *sous* la peau, et il est intéressant de déterminer si ces animaux se trouvent par là immunisés à un degré quelconque contre l'inoculation *dans* la peau d'une culture virulente.

Le tableau ci-dessus montre comment se comportent, vis-à-vis de l'inoculation *dans* la peau d'une culture charbonneuse virulente, les animaux qui ont survécu à l'inoculation *sous* la peau d'une grande quantité de cette culture.

Dans cette série d'expériences on a pu voir que pas un des animaux qui ont survécu à l'inoculation de 1 cent. cube de virus charbonneux *sous* la peau, n'ont pu supporter 0 c. c. 1

(1) *C. R. Soc. Biol.*, 1923, **89**, p. 1122.

d'un bouillon de culture de vingt-quatre heures, introduit dans la peau.

Sur 3 lapins, 1 seulement a résisté à 0,01; un lapin qui a reçu 1/300<sup>e</sup> cent. cube dans la peau est mort, et sur les 3 qui ont reçu 0 c. c. 002 dans la peau, 2 ont survécu et 1 est mort.

Un lapin ayant reçu 1/600<sup>e</sup> cent. cube dans la peau a résisté, et sur 2 lapins ayant reçu 0 c. c. 001 dans la peau, 1 est mort et l'autre a résisté.

Ceci indique, d'une manière évidente, que même lorsqu'il y a protection apparente, celle-ci n'est pas accusée. Cela apparaît particulièrement dans le cas du lapin qui l'avait survécu à l'inoculation de 1 cent. cube de virus sous la peau et a été incapable de résister à 0 c. c. 001 d'une culture quand l'inoculation a été faite dans la peau.

Nous venons de voir que l'injection de virus *sous* la peau, même à une dose très élevée, ne confère pas d'immunité ou ne confère qu'une immunité à peine appréciable. Il restait à voir comment se comporte l'animal qui avait reçu du virus *dans* la peau. A cet effet nous avons procédé à l'expérience suivante :

*Lapin C<sub>2</sub>, 1.685 gr.*

18 décembre . .	Reçoit dans la peau	1/4 cent. cube de 1 <sup>er</sup> vaccin.
19 décembre . .	—	— la même dose.
21 décembre . .	—	— 1/20 cent. cube de 2 <sup>e</sup> vaccin.
3 janvier . .	—	— 4/20 cent. cube de 2 <sup>e</sup> vaccin.
7 janvier . .	—	— 1/4 cent. cube de 2 <sup>e</sup> vaccin.
12 janvier . .	Éprouvé —	avec 1/2 cent. cube de virus en bouillon de 24 heures.

Le lapin présente, deux jours après, un léger œdème circonscrit qui disparaît le 16 janvier.

*Lapin C<sub>60</sub>, témoin, 2.000 gr.*

12 janvier, il reçoit, en même temps que le précédent, 1/1.000 cent. cube de virus du bouillon de 24 heures dans la peau. Le 15 janvier il est mort du charbon.

Cette expérience montre avec évidence que la bactéridie injectée dans la peau confère une immunité telle que le lapin est susceptible de résister à 500 doses mortelles. Rappelons que la dose de virus atténue (1 cent. cube), injecté dans cette expérience *dans* la peau, fut la même que celle de virus pur, qui, introduite *sous* la peau, fut incapable de vacciner l'animal.

## CONCLUSIONS.

1<sup>o</sup> Le lapin peut être inoculé *sous* la peau avec une forte dose de culture charbonneuse et survivre, à moins que la bactéridie se trouve en contact avec une déchirure de la peau;

2<sup>o</sup> Le lapin qui a survécu à l'inoculation d'une dose massive de virus charbonneux *sous* la peau n'acquiert qu'une immunité très faible ou nulle;

3<sup>o</sup> Le lapin qui a été injecté avec du virus atténué *dans* la peau acquiert un haut degré d'immunité.

Ces résultats viennent confirmer les principes généraux sur l'immunité locale établis par Besredka.